

**GERALDO PICHETH**

**Associação de polimorfismos do gene do receptor de  
AGEs (RAGE) com fatores de risco para a doença  
coronariana em indivíduos com e sem  
*Diabetes mellitus.***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadores:

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Tânia Leme Rocha Martinez

Curitiba  
2007

Dedicado à

*Aimée*  
*Cyntia*  
*Eduardo*  
*Felipe*  
*Guilherme*  
*Ivan*  
*Maria*

*“Preferi a sabedoria aos cetros e tronos e, em comparação com ela, julguei sem valor a riqueza; a ela não igualei nenhuma pedra preciosa, pois, a seu lado, todo o ouro do mundo é um punhado de areia e, diante dela, a prata será como lama.”*

Sb 7, 8-9

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores professores doutores Emanuel Maltempi de Souza e Tania Leme da Rocha Martinez pela dedicação e segurança que me ofereceram para desenvolver este projeto.

Ao meu amigo Emanuel Souza agradeço por tudo, em especial pela paciência que teve comigo; por ter sido condescendente com meus inúmeros erros durante o aprendizado e por me orientar para o futuro. Tenho a certeza que este projeto não teria êxito sem sua participação.

À minha amiga Tânia Martinez. Não há como agradecer adequadamente a quem sugeriu o tema desta tese e sempre esteve disponível para me ajudar. Obrigado.

Ao médico Costantino Ortiz Costantini que acreditou neste trabalho e colaborou na obtenção das amostras e nas análises das angiografias.

À Fabiane por tudo que me ajudou e pelas inúmeras conversas que só me fizeram bem.

Aos velhos amigos Akira, Dib, Sandra, Janaína e Patrícia por tanto tempo de amizade. Saibam que vocês são parte de minha família. Aos novos membros Mauren, Carol, Gabriel, Márcia e Michelle sejam bem-vindos a minha vida.

Aos professores que atuam na Pós-Graduação da Bioquímica, em especial a Rose Adele Monteiro, Leda Chubatsu, Berenice Steffens, Roseli Wassen e Fábio Pedrosa, cuja amizade frutificou com o tempo.

À Marileia pelo constante incentivo.

Ao “povo” do laboratório, em especial a turma da 275 por terem me aturado por tanto tempo.

A dona Julieta (dona Ju), a Roseli, ao Valter, que com suas presenças alegres e amigas amenizaram os dias difíceis.

Aos meus colegas do Laboratório Frischmann Aisengart pela inestimável ajuda em muitos ensaios. Em especial à minha mais diletta amiga Dra Kazuko Koto cuja ajuda neste projeto e em vários momentos de minha vida não tenho como agradecer o suficiente.

Aos meus pais (Felipe e Aimée) que com muita paciência e orações constantes me ofereceram o chão seguro que tenho.

A família que sempre esteve comigo: aos filhos Guilherme, Eduardo, aos sogros Ivan Fadel e Maria (*em memória*), aos cunhados Marcus Vinícius, Ana, Ivan, Carla, Cristina, Vânia e Jean. O apoio de vocês foi e continuará sendo muito importante para mim.

Para a Cyntia. Sem ela não sou ninguém.



## SUMÁRIO

	pág.
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	x
<b>RESUMO</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica</b>	<b>3</b>
2.1 Produtos de Glicação Avançada (AGEs)	3
2.2 Patofisiologia relacionada aos AGEs	7
2.3 Patologias associadas aos AGEs	9
2.4 Receptores celulares para os AGEs	10
2.4.1 O receptor RAGE	11
2.4.2 Variabilidade genética do receptor RAGE	15
<b>3 Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>4 Materiais e Métodos</b>	<b>23</b>
4.1 Amostra	23
4.1.1 Classificação da amostra e critérios diagnósticos	23
4.1.2 Amostras de diabéticos tipo 1	26
4.2 Extração do DNA genômico	26
4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
4.4 Reações de RFLP	29
4.5 Reações de SSCP	30
4.6 Sequenciamento de produtos de PCR	31
4.7 Quantificação dos Produtos de Glicação Avançada	32
4.8 Quantificação dos parâmetros bioquímicos	33
4.9 Análises estatísticas	34
<b>5 Resultados</b>	<b>35</b>
5.1 Caracterização da amostra	35
5.2 Análises de PCR-RFLP	40
5.3 Análises de PCR-SSCP	49
5.4 Análises de sequenciamento de DNA	52
5.5 Análises de correlação	55
5.6 Associação entre a concentração da HbA <sub>1C</sub> e polimorfismos de RAGE em diabéticos tipo 2	58
5.7 Polimorfismo -374 T>A e severidade da DAC	59
5.8 Análise da região promotora de RAGE em diabéticos tipo 1	60
<b>6 Discussão</b>	<b>61</b>
6.1 Amostra	61
6.1.1 Características demográficas da amostra	62

6.1.2 Parâmetros laboratoriais	64
6.1.3 Concentração sérica de AGEs	68
6.1.3 Características angiográficas da amostra	68
6.2 Análises dos polimorfismos detectados por PCR-RFLP	69
6.2.1 Análises das frequências alélicas e genotípicas	70
6.2.1.1 Polimorfismo -429 T>C da região promotora de RAGE	71
6.2.1.2 Polimorfismo -374 T>A da região promotora de RAGE	73
6.2.1.3 Deleção de 63 pb da região promotora de RAGE	77
6.2.1.4 Polimorfismo G82S do exon 3 de RAGE	77
6.3 Análises de PCR-SSCP	80
6.4 Análises de correlação e associação	81
6.4.1 Associação dos polimorfismos de RAGE com as concentrações de Hemoglobina glicada em diabéticos	83
6.5 Polimorfismo -374 T>A e severidade da DAC	84
6.6 Polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora de RAGE em diabéticos tipo 1	86
<b>7 Conclusões</b>	<b>88</b>
<b>8 Referências Bibliográficas</b>	<b>90</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>109</b>
Anexo 1. Planilha de coleta de dados	109
Anexo 2. Índice de classificação da severidade da doença arterial coronária (Índice de Duke)	110
Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido – HC - UFPR	111
Anexo 4. Isolamento de DNA genômico de sangue total	112

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Principais etapas na formação dos produtos de glicação avançada (AGEs)	pág. 4
<b>Figura 2</b>	Estrutura de alguns produtos de glicação avançada	6
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática do resultado de <i>cross-link</i>	8
<b>Figura 4</b>	Comparação entre as estruturas do RAGE com imunoglobulinas	11
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da interação do AGE com o domínio V do RAGE	12
<b>Figura 6</b>	Estrutura do gene RAGE e seus principais produtos	13
<b>Figura 7</b>	Mapa da localização dos polimorfismos do gene RAGE	17
<b>Figura 8-A</b>	Mapa de restrição com <i>Alu</i> I para região promotora de RAGE	40
<b>Figura 8-B</b>	Perfil eletroforético da reação de PCR-RFLP para a região promotora de RAGE com a enzima <i>Alu</i> I	40
<b>Figura 9-A</b>	Mapa de restrição com <i>Tsp</i> 509 I para região promotora de RAGE	41
<b>Figura 9-B</b>	Perfil eletroforético da reação de PCR-RFLP para a região promotora de RAGE com a enzima <i>Tsp</i> 509 I	41
<b>Figura 10-A</b>	Perfil eletroforético em agarose a 2% para detecção da deleção de 63 pb (63Del)	42
<b>Figura 10-B</b>	Perfil eletroforético das reações de PCR-RFLP para a região promotora de RAGE com as enzimas <i>Alu</i> I e <i>Tsp</i> 509 I evidenciando a deleção de 63 pb	42
<b>Figura 11-A</b>	Mapa de restrição com <i>Alu</i> I para região do exon 3 de RAGE	43
<b>Figura 11-B</b>	Perfil eletroforético da reação de PCR-RFLP para a região do exon 3 de RAGE com a enzima <i>Alu</i> I	43
<b>Figura 12</b>	Perfil eletroforético para PCR-SSCP para a região promotora de RAGE	49
<b>Figura 13</b>	Perfil eletroforético (montagem de vários géis) para a reação de PCR-SSCP para a região promotora de RAGE com destaque para análise de heteroduplex	50
<b>Figura 14</b>	Perfil eletroforético (montagem de vários géis) para a reação de PCR-SSCP para a região do exon 3 de RAGE	51
<b>Figura 15</b>	Eletroforetograma da reação de sequenciamento da região do exon 3 de RAGE	52
<b>Figura 16</b>	Eletroforetograma da reação de sequenciamento da região promotora de RAGE	53
<b>Figura 17</b>	Alinhamento do sequenciamento da região promotora de RAGE evidenciando a deleção de 63 pb em homozigose	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Receptores para AGEs	pág. 10
<b>Tabela 2</b>	Polimorfismos do gene RAGE	16
<b>Tabela 3</b>	Frequência genotípica e alélica para o polimorfismo -429T>C da região promotora de RAGE reportadas na literatura	19
<b>Tabela 4</b>	Frequência genotípica e alélica para o polimorfismo -374 T>A da região promotora de RAGE reportadas na literatura	20
<b>Tabela 5</b>	Frequência genotípica e alélica para o polimorfismo G82S da região do exon 3 do gene RAGE reportadas na literatura	21
<b>Tabela 6</b>	Critérios para classificação da amostra	25
<b>Tabela 7</b>	Condições para reação de PCR para amplificação das regiões polimórficas do gene RAGE em estudo	28
<b>Tabela 8</b>	Protocolos para reações de RFLP	29
<b>Tabela 9</b>	Preparo e condições de ensaio para a reação de SSCP	31
<b>Tabela 10</b>	Características demográficas e clínicas da amostra	36
<b>Tabela 11</b>	Média, desvio padrão ( $M \pm DP$ ) e amplitude de variação (AV) para o perfil lipídico e indicadores de risco para DAC nos grupos	37
<b>Tabela 12</b>	Média, desvio padrão ( $M \pm DP$ ) e amplitude de variação (AV) para marcadores do controle glicêmico, função renal, proteínas e AGEs fluorescentes nos grupos em estudo	38
<b>Tabela 13</b>	Características angiográficas da amostra	39
<b>Tabela 14</b>	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo -429T>C na amostra em estudo	44
<b>Tabela 15</b>	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo -374T>A na amostra em estudo	45
<b>Tabela 16</b>	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas para a deleção de 63 pb (63Del) na amostra em estudo	46
<b>Tabela 17</b>	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo G82S na amostra em estudo	47
<b>Tabela 18</b>	Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A	48
<b>Tabela 19</b>	Resultados significativos ( $P < 0,05$ ) para análise de correlação linear (coeficiente de Pearson) entre os polimorfismos e parâmetros em estudo	55
<b>Tabela 20</b>	Polimorfismos -429T>C, -374T>A e G82S do gene RAGE e valores de probabilidade (P) da análise de variância (ANOVA) de parâmetros laboratoriais nos grupos em estudo.	56
<b>Tabela 21</b>	Valores de média e desvio padrão para os analitos que apresentaram diferença significativa em qualquer dos polimorfismos em estudo	57

<b>Tabela 22</b>	Distribuição dos valores de Hemoglobina glicada (HbA1C) em relação aos polimorfismos de RAGE no grupo com diabetes tipo 2 (DM2+DAC+).	58
<b>Tabela 23</b>	Distribuição genotípica e indicadores de severidade da DAC associados ao polimorfismo -374T>A na população em estudo	59
<b>Tabela 24</b>	Comparações entre as frequências genotípica e alélica de indivíduos diabéticos tipo 1 (DM1) com não diabéticos (NDM).	60
<b>Tabela 25</b>	Comparações entre as frequências do alelo C nos grupos em estudo para o polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE com dados da literatura	72
<b>Tabela 26</b>	Comparações entre as frequências do alelo A nos grupos em estudo para o polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE com dados da literatura	75
<b>Tabela 27</b>	Comparações entre as frequências do alelo S nos grupos em estudo para o polimorfismo G82S da região do exon 3 do gene RAGE reportados na literatura	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AGE</b>	Produtos finais de Glicação Avançada; <i>Advanced Glycation End Products</i>
<b>AGER</b>	Receptor para Produtos de Glicação Avançada – sinônimo de RAGE
<b>Água ultra-pura</b>	Água com condutividade igual ou superior a 18 MΩ-cm, obtida em equipamento Milli-Q (Millipore)
<b>CTRL</b>	Grupo controle, apresentando ausência de DM2 e DAC
<b>DAC</b>	Doença arterial coronariana
<b>DAC+</b>	Grupo positivo para doença arterial coronariana
<b>DM1</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
<b>DM2</b>	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
<b>DM2+DAC+</b>	Grupo apresentando DM2 associado a DAC
<b>HbA<sub>1C</sub></b>	Hemoglobina Glicada A <sub>1C</sub>
<b>IAM</b>	Infarto agudo do miocárdio
<b>HDL-C</b>	Colesterol da fração HDL (lipoproteína de alta densidade)
<b>LDL-C</b>	Colesterol da fração LDL (lipoproteína de baixa densidade)
<b>PPAR</b>	Receptores de proliferação ativada do peroxissomo, <i>Peroxisome proliferator activated receptors</i>
<b>RAGE</b>	Receptor para Produtos de Glicação Avançados, <i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>
<b>sRAGE</b>	RAGE solúvel. Isoformas de RAGE que não têm a porção transmembrana sendo secretadas no plasma
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição; <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>SNP</b>	Polimorfismos de único nucleotídeo, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de Conformação de Fita Simples, <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
<b>TG</b>	Triglicérides

## RESUMO

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são formados pela reação não enzimática entre um açúcar e grupamentos amino de proteínas. Estas moléculas têm suas concentrações nos fluídos biológicos aumentadas em patologias como diabetes, insuficiência renal e processos inflamatórios. O Receptor para Produtos de Glicação Avançada (RAGE) é o receptor AGEs melhor caracterizado. RAGE é membro da família das imunoglobulinas e sua ativação por AGEs promove a liberação de várias citocinas associadas ao processo proinflamatório. Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do gene RAGE na região promotora (-429T>C; 63Del e -374T>A) alteram a expressão de RAGE e uma mutação não sinônima no exon 3 (G82S) estão associados a processos patológicos como o diabetes e a doença cardiovascular. Neste trabalho foram estudados 320 indivíduos, 95% Euro-brasileiros, angiograficamente avaliados para detecção de doença arterial coronariana (DAC) com o objetivo de estudar os polimorfismos genéticos da região promotora e exon 3 do RAGE e associar com níveis séricos de AGEs, marcadores bioquímicos para DAC e diabetes (hemoglobina glicada). A amostra foi subclassificada em 3 grupos quanto a presença (+) e ausência (-) de DAC e *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Os grupos controle (ausência de DM2 e DAC, n=81); DM2+DAC+ (n=91) e DAC+ (n=148) foram estudados para variáveis demográficas e clínicas, parâmetros laboratoriais, concentração sérica de AGEs fluorescentes e polimorfismos de RAGE. As quantificações laboratoriais foram realizadas por métodos automatizados e a detecção dos polimorfismos realizada por PCR-RFLP e PCR-SSCP sendo estas técnicas validadas pela reação de seqüenciamento de DNA. O índice aterogênico do soro, caracterizado pela relação  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ , foi o marcador laboratorial que melhor discriminou entre os grupos em estudo, sendo sugerida sua utilização na rotina laboratorial. As concentrações de Hemoglobina Glicada ( $\text{HbA}_{1\text{C}}$ ) em indivíduos do grupo DM2+DAC+ não apresentaram correlação com os polimorfismos estudados. Na população estudada as frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del e G82S são similares às descritas para outras populações caucasóides e diferem significativamente daquelas descritas para orientais. Os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del e G82S não estão associados ao aparecimento da doença arterial coronariana na presença ou ausência do diabetes tipo 2. Os indivíduos com o genótipo G82S (GS) no grupo DM2+DAC+ apresentaram concentrações de marcadores de risco para DAC (colesterol total, LDL-C, TG e  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ ) e de AGEs fluorescentes no soro significativamente maiores que aqueles de genótipo G82G (GG), sugerindo que os diabéticos portadores da mutação que introduz uma serina no codon 82 da proteína RAGE possam ser mais susceptíveis à doença cardiovascular. O genótipo -374AA da região promotora de RAGE está associado a menor severidade da doença arterial coronariana em indivíduos com diabetes tipo 2, sugerindo que o alelo -374A em homozigose exerça um fator de proteção em relação à DAC. Também ficou demonstrado que o polimorfismo -429T>C está associado ao *Diabetes mellitus* tipo 1 em uma população Brasileira com o alelo C apresentando uma frequência 2 vezes maior nos indivíduos diabéticos quando comparados a não diabéticos.

## ABSTRACT

The advanced glycation end products (AGEs) were formed by the non-enzymatic reaction of a carbohydrate and the amino group of proteins. In pathologies such as diabetes, kidney disease and inflammatory processes the concentrations of AGEs increase in biological fluids. Of all AGEs receptors the Receptor for Advanced Glycation end products (RAGE) is the most studied. RAGE is a member of the immunoglobulin family and its activation promotes the liberation of several cytokines associated with inflammatory processes. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the RAGE gene in the promoter region (-429T>C; 63Del e -374T>A) modified RAGE expression and together with a non-synonymous mutation in the exon 3 (G82S) were associated with pathological processes such as diabetes and cardiovascular disease. This study comprised 320 subjects, 95% Euro-Brazilians, characterized by coronary artery disease (CAD) by angiography; the objective was to study the association between the genetic polymorphisms of the promoter and exon 3 regions of RAGE and the serum levels of AGEs, biochemical markers for CAD and diabetes (glycated hemoglobin). The patient sample was divided into 3 groups with respect to the presence (+) or absence (-) of CAD and type 2 *Diabetes mellitus* (DM2). The control group (absence of DM2 and CAD, n=81); the DM2+CAD+ group (n=91) and the CAD+ group (n=148) were studied for clinical and demographic variables, laboratory parameters, fluorescent AGEs serum levels and polymorphisms of RAGE. The laboratory measurements were performed by standard automated methodologies and polymorphisms were detected by PCR-RFLP and PCR-SSCP with validation by DNA sequencing. The atherogenic index of plasma characterized by the ratio log(TG/HLC-C) showed the best laboratory marker for group differentiation, so the use of this parameter is suggested for clinical laboratory routine. The glycated hemoglobin levels (HbA<sub>1C</sub>) in the group DM2+CAD+ were not correlated with the studied polymorphisms. In the studied population the allelic and genotype frequencies for the polymorphisms -429T>C, -374T>A, 63Del and G82S were similar to those in other Caucasian populations and significantly different from Orientals. The polymorphisms -429T>C, -374T>A, 63Del and G82S were not associated with coronary artery disease in the presence or absence of type 2 *Diabetes mellitus*. The subjects with G82S (GS) genotype in the group DM2+CAD+ showed a significant increase in serum levels of risk markers for CAD (total cholesterol, LDL-C, TG and log(TG/HDL-C) and fluorescent AGEs when compared with subjects with the G82G (GG) genotype, suggesting that the carriers of a mutation that introduces a serine in codon 82 of the RAGE protein could be more susceptible to cardiovascular disease. The genotype -374AA of RAGE promoter gene is associated with less severity for CAD in subjects with type 2 diabetes suggesting that the -374A allele in homozygosis acts as a protective factor associated with CAD. We also showed that the -429T>C polymorphism is associated with type 1 *Diabetes mellitus* in a Brazilian population with a two fold increase of C-allele frequency in diabetic compared with non-diabetic subjects.



## 1. Introdução

Os produtos de glicação são produzidos pela reação não enzimática de açúcares redutores com biomoléculas como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Aqueles designados produtos de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*), são os aductos formados entre o açúcar redutor e o grupamento amino de proteínas. Os AGEs representam um grupo variado e estruturalmente complexo, com algumas formas apresentando fluorescência característica. As concentrações de AGEs no soro e tecidos são aumentadas significativamente na presença de patologias em que o estresse oxidativo aumenta, notadamente no processo inflamatório, o *Diabetes mellitus* e a insuficiência renal.

Alguns receptores celulares interagem com os AGEs e possivelmente participam do *clearance* destas moléculas. Entre os receptores para AGEs mais estudados está o receptor para produtos de glicação avançados (RAGE), que pertence à família das imunoglobulinas. A interação AGE-RAGE desencadeia uma transdução de sinal com ativação da transcrição de várias proteínas intracelulares. A resultante da estimulação do RAGE favorece o processo aterogênico e trombogênico. Outras moléculas também interagem com RAGE, caracterizando-o como um receptor multiligante. A administração da fração solúvel do receptor RAGE (sRAGE), com capacidade intacta para ligar AGEs, a animais de laboratório, levou a uma melhora nas complicações associadas ao diabetes, à doença renal e ao processo aterosclerótico. Estes estudos têm propiciado especular que AGEs e RAGE, e certamente a resposta desta interação, sejam alvo importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo patofisiológico e na busca de terapias para as patologias citadas, as quais em geral afetam de forma crônica uma grande parcela da população mundial.

Vários polimorfismos estão descritos para o gene RAGE, com destaque para aqueles decorrentes da substituição de um único nucleotídeo (SNPs), localizados na região promotora e no exon 3. Esta última região codifica o possível sítio de ligação para os AGEs. Os poucos estudos destes polimorfismos e suas implicações no diabetes

e na doença cardiovascular na população brasileira nos motivou a procurar associações entre os polimorfismos de RAGE, diabetes e doença cardiovascular. Deve ser ressaltado, também, o crescente aumento na frequência do diabetes e da doença cardiovascular em países em desenvolvimento como o Brasil. Hoje estas patologias são caracterizadas como epidemias e representam as principais causas de morbidade e mortalidade na população com elevados custos ao sistema de saúde.

Portanto, estudos como o presente, que permitem identificar características associadas às complicações do diabetes como a doença cardiovascular, podem oferecer suporte para novas abordagens diagnósticas, terapêuticas e epidemiológicas.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Produtos de Glicação Avançados (AGEs)

Os açúcares redutores como a glicose são capazes de reagir com proteínas de forma não enzimática em reações denominadas de glicação, glucosilação ou glicosilação (MIYATA *et al.*, 1997). Este tipo de reação tem início com a formação reversível de uma base de Schiff entre o açúcar e o aminogruppo de uma proteína que evolui para formar um intermediário estável, designado produto de Amadori. Após uma complexa e repetida cascata de reações de desidratação, condensação, oxidação e ciclização, que podem demandar meses, formam-se os produtos de glicação avançados ou AGEs (da sigla inglesa *Advanced Glycation End products*), também conhecidos como produtos avançados de Maillard (NAGARAJ *et al.*, 1996; BOOTH, *et al.*, 1997; KIKUCHI *et al.*, 2003). A Figura 1 representa os principais passos na formação dos AGEs.

Compostos contendo  $\alpha$ -dicarbonilas como a 3-deoxiglucosona (3-DG), o glicoxal (GO) e o metil glioxal (MG) exercem função relevante na formação dos AGEs (BIEMEL *et al.*, 2002). Enquanto a 3-DG é formada essencialmente a partir do produto de Amadori, o GO e o MG derivam *in vivo* e *in vitro* primariamente da degradação enzimática ou não enzimática de intermediários triose fosfato (AHMED *et al.* 1997). O estresse oxidativo, que revela o nível de radicais reativos de oxigênio em um sistema biológico, tem uma função relevante de estímulo na formação dos AGEs (MIYATA *et al.*, 1997).

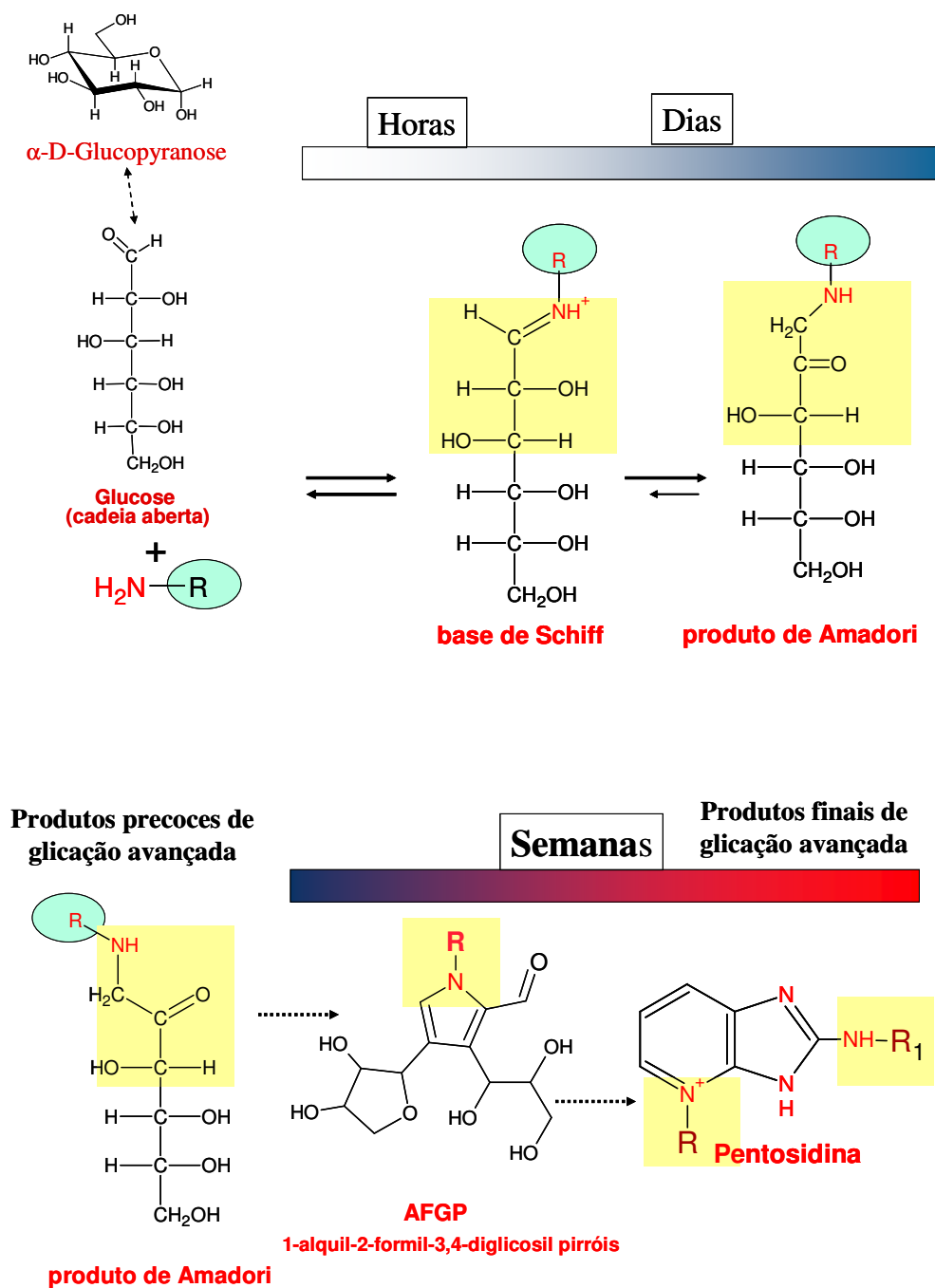
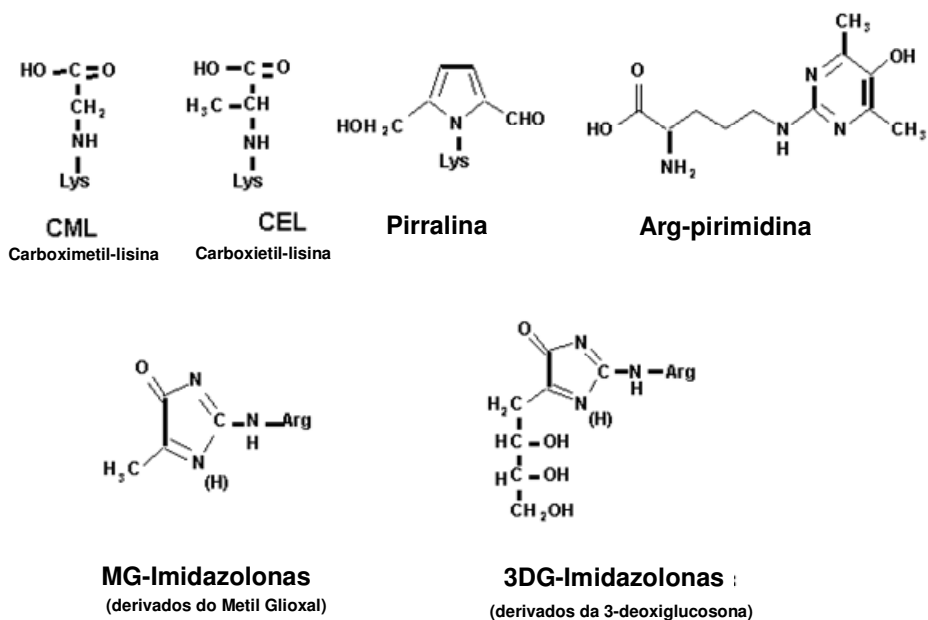


Figura 1. Principais etapas na formação dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs). Adaptado de ARONSON e RAYFIELD, 2002.

Os AGEs mais representativos são: N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro (IKEDA *et al.*, 1996), N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL), pirralina, dímero de lisina e derivado do glioxal (GOLD), dímero de lisina e derivado do metil glioxal (MOLD), dímero de lisina e derivado da 3-deoxiglucosona (DOLD), pirralina, AFGP (1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-*H*-imidazol) e os fluoróforos pentosidina e argpirimidina (SCHLEICHER *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2002; KIKUCHI *et al.*, 2003).

A Figura 2 mostra as principais estruturas dos AGEs classificadas por sua capacidade de apresentar fluorescência e de formação de ligações cruzadas (*crosslink*) entre proteínas.

### AGEs não-fluorescentes



### AGEs fluorescentes e formadores de ligação cruzada (*crosslink*)

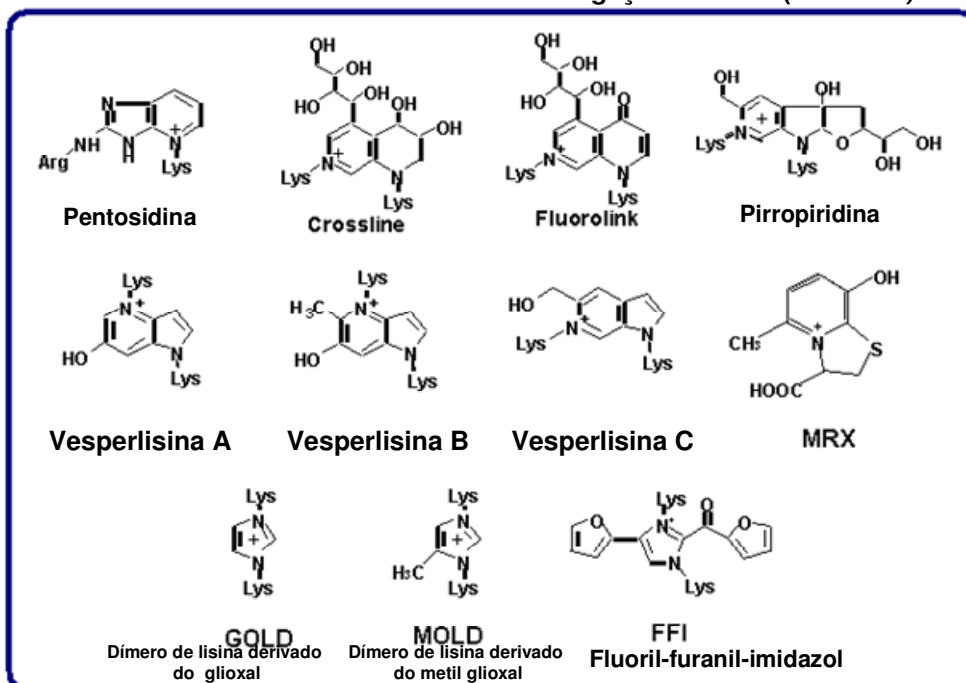


Figura 2. Estrutura dos principais AGEs. Adaptado de SCHLEICHER *et al.* 2001.

Ao longo da última década têm se acumulado evidências da participação dos AGEs em várias patologias, com destaque para o *Diabetes mellitus*, a aterosclerose, a insuficiência renal e o processo de envelhecimento (AHMED *et al.* 1997).

## **2.2 Patofisiologia relacionada aos produtos finais de glicação avançada (AGEs).**

Segundo VLASSARA *et al.* (1994), as principais propriedades patológicas dos AGEs podem ser descritas como:

- Estimulação de citocinas e fator de crescimento a partir de macrófagos;
- Aumento da permeabilidade endotelial e atividade procoagulante;
- Indução da migração transendotelial de monócitos/macrófagos;
- Agrupamento de moléculas não-AGEs subsequentemente levando a:
  - Formação de complexos imunes;
  - Acúmulo de lipoproteínas
  - Ativação do complemento
- Favorecimento na síntese de componentes da matriz extracelular;
- Estímulo à proliferação celular;
- Inibição da atividade do óxido nítrico;
- Indução na produção de interferon- $\gamma$  por linfócitos T na presença de co-estímulos;
- Aumento na taxa de mutação do DNA.

Um dos aspectos centrais relacionando os AGEs a processos patológicos decorre que alguns destes compostos podem propiciar ligações cruzadas (*cross-links*) entre proteínas, levando à alterações funcionais daquelas atingidas no processo (EBLE *et al.*, 1983; MIYATA *et al.*, 1997). A Figura 3 mostra de forma esquemática o processo de ligação cruzada (*crosslink*).

Várias drogas que clivam as ligações cruzadas entre os AGEs e proteínas vêm sendo testadas *in vivo* e *in vitro* com fins terapêuticos como inibidoras das complicações do diabetes e da doença arterial coronária (ASIF *et al.*, 2000). A aminoguanidina e mais recentemente compostos como o ALT-711, derivados de vitamina B1 e B6 vem demonstrando eficácia na melhora de função arterial e nas alterações renais em ratos diabéticos, abrindo novas perspectivas de tratamento nestas patologias (WOLFFENBUTTEL *et al.*, 1998).

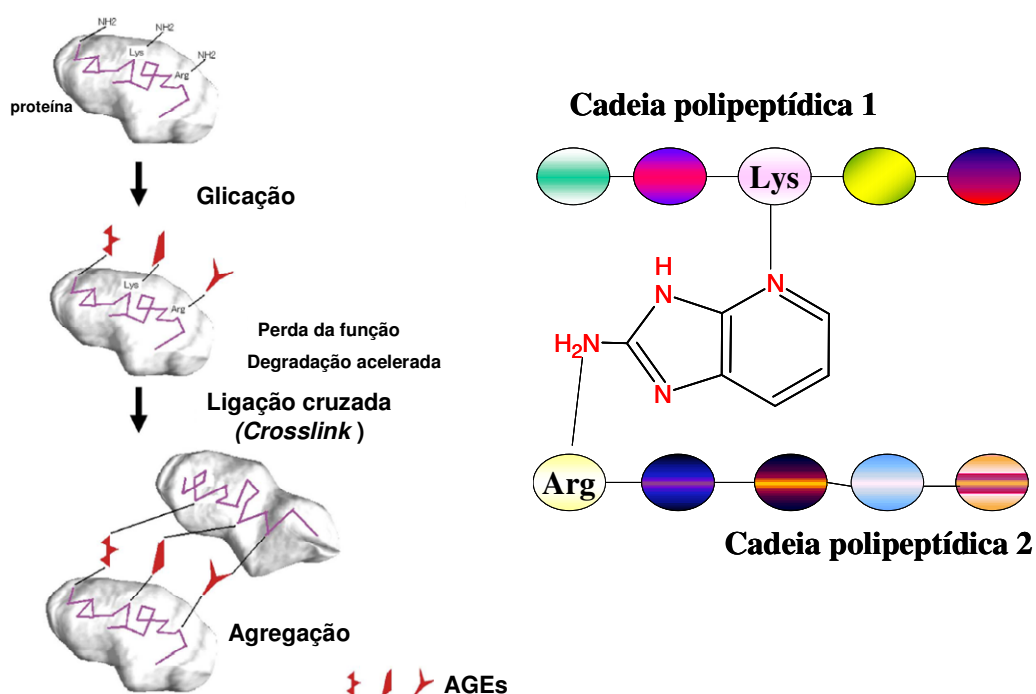


Figura 3. Representação esquemática da formação de ligações cruzadas (*crosslink*) entre proteínas mediadas por AGEs. Estão representadas duas distintas cadeias polipeptídicas ligadas por AGEs. À direita um exemplo do AGE pentosidina ligando duas cadeias polipeptídicas. Adaptado de MIYATA *et al.* 1997 e KIKUCHI *et al.*, 2003.



### 2.3 Patologias relacionadas aos AGEs.

#### *Diabetes mellitus.*

Os produtos de glicação avançados estão intimamente relacionados às complicações do paciente com *Diabetes mellitus* (HAMMES, 2003). Concentrações séricas de glucose elevadas por longos períodos favorecem a produção dos AGEs (BLOOMGARDEN, 2000; NISHIKAWA *et al.*, 2000).

Complicações do diabetes como a retinopatia (AMANO *at al.*, 2001), lesão vascular como a doença arterial coronária (KIKHOVD *et al.*, 1999; KIUCHI *et al.*, 2001; POIRIER e ECKEL, 2000) e insuficiência renal têm sido relacionadas aos níveis de AGEs em vários tecidos (MENE *et al.*, 2001).

Os produtos de glicação avançada (AGEs) estão associados às complicações do paciente com diabetes tais como o desenvolvimento da doença arterial coronária e a insuficiência renal (BROWNLEE *et al.*, 1988).

#### **Insuficiência renal e diálise**

A insuficiência renal associa a dificuldade na eliminação dos AGEs ao seu possível aumento de produção decorrente do estresse metabólico que acompanha a patologia (ZOCCALI *et al.*, 2000; ZOCCALI *et al.*, 2001). Os AGEs vêm sendo extensivamente estudados como marcadores da lesão renal (TESSITORE *et al.*, 2001), bem como agentes amplificadores da lesão (HORL, 2000; GERDEMANN *et al.*, 2000)

#### **Outras patologias relacionadas aos AGEs.**

- A alimentação com produtos contendo AGEs, freqüentemente designados “glicotoxinas”, potencialmente podem estar associados às complicações dos pacientes com diabetes (KOSCHINSKY *et al.*, 1997)
- Envelhecimento e alterações do colágeno relacionados aos AGEs (VLASSARA, 1994; BROWNLEE, 1995; PAUL e BAILEY, 1996)
- Doença de Alzheimer (LI e DICKSON, 1997)

- Reabsorção óssea onde os AGEs estão envolvidos na patofisiologia do remodelamento ósseo (MIYATA *et al.*, 1996)

## 2.4 Receptores celulares para os produtos de glicação avançada.

Vários receptores celulares, que apresentam capacidade de ligação com os AGEs, foram identificados em diferentes tipos de células. A Tabela 01 mostra estes receptores e sua nomenclatura (VLASSARA *et al.*, 1995; POIRIER *et al.*, 2001 e MIYAZAKI *et al.* 2002). Entre estes, apenas os receptores RAGE e galectina-3 não se enquadram na designação de “receptores da família *scavenger*”.

Tabela 01. Receptores para AGEs

Sigla	Nomenclatura	Características
RAGE	AGER	Receptor para produtos de glicação avançada (cromossomo 6p21.3)
AGE-R1	OST-48	Oligosacaril transferase-4 (cromossomo 1p36.1)
AGE-R2	PRKCSH	Substrato da Proteína quinase C (cromossomo 19)
AGE-R3	LGAL31	Galectina-3 (cromossomo 14q21.p22)
LOX-1	LOX-1	Lecitina semelhante a lipoproteína LDL oxidada
SR-A	Classe A	Receptores <i>scavenger</i> de macrófagos classe A tipos I e II
SR-BI	---	Receptor que faz a endocitose da LDL acetilada
CD-36	CD-36	Multiligante (ácidos graxos, colágeno, LDL oxidada entre outros)



Alzheimer, a expressão do RAGE é extraordinariamente aumentada nas células afetadas (SCHMIDT e STERN, 2000).

A região extracelular do RAGE consiste de um domínio de imunoglobulina do tipo V (variável) seguido por dois domínios de imunoglobulina do tipo C (constante) estabilizados por pontes de enxofre internas entre resíduos de cisteína. O domínio V contempla dois supostos sítios para produtos de glicação N-ligados (HUTTUNEN, 1996). A figura 4 mostra uma descrição esquemática do RAGE e sua interação com os AGEs no domínio V (SCHMIDT e STERN, 2000).

Embora o RAGE tenha sido caracterizado como receptor para AGEs heterogêneos, estudos recentes têm mostrado que o RAGE associado a AGEs funciona na transdução de sinal para diferentes fatores de transcrição (SCHMIDT *et al.* 2000; SCHMIDT e STERN, 2000). O receptor RAGE está caracterizado como multiligante, sendo capaz de interagir também com as proteínas fibrilas  $\beta$ -amilóides, S100/calgranulinas e com a anfoterina (STERN *et al.*, 2002). A figura 5 mostra de forma esquemática a estrutura do receptor RAGE.

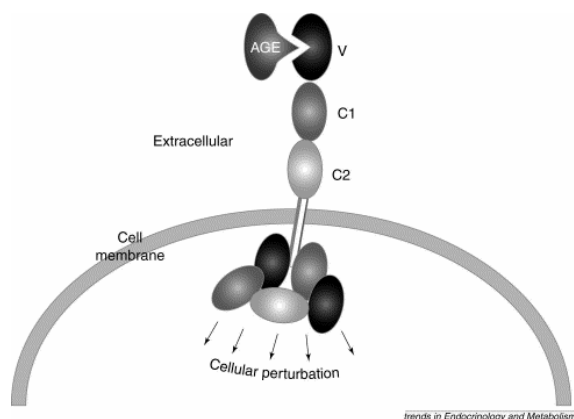


Figura 5. Representação esquemática da interação do AGE com o domínio V do RAGE. O domínio extracelular do RAGE é formado por um domínio de tipo V seguido por dois domínios do tipo C (C1 e C2). Um único domínio transmembrana de ancoragem fixa o RAGE na membrana e uma pequena cauda citosólica, altamente carregada, media a interação com as moléculas sinalizadoras de transdução citosólicas (retirado de SCHMIDT E STERN, 2000).

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) humano foi mapeado no cromossomo 6p21.3 (VISSING *et al.*, 1994). O gene está localizado no complexo principal de histocompatibilidade entre as regiões de classe II e de classe III (SUGAYA *et al.*, 1994, GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769). Este gene é composto de 1,7 kb e 11 exons, sendo o domínio de imunoglobulina do tipo V codificado pelos segundo e terceiro exons (SUGAYA *et al.*, 1994). A estrutura do gene RAGE e seus principais produtos está representada na Figura 06.

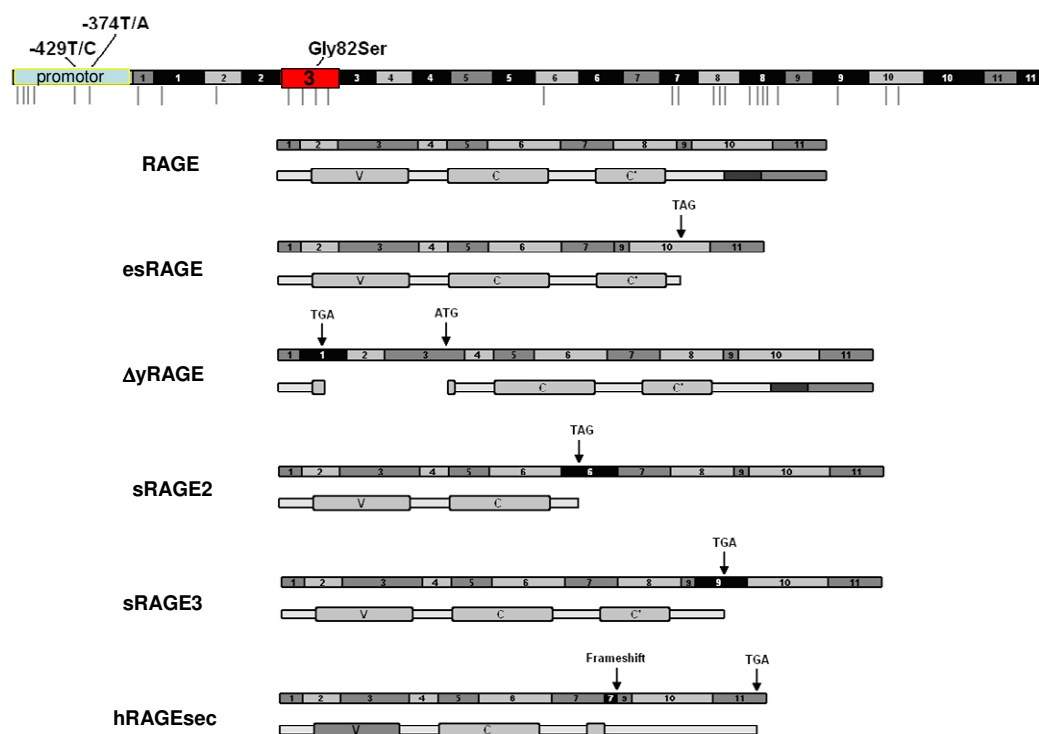


Figura 06. Estrutura do gene RAGE e seus principais produtos. RAGE proteína completa, perda da cauda citosólica (esRAGE, secreção endógena) e formas solúveis derivadas da perda da porção transmembrana (ΔyRAGE, sRAGE 2, sRAGE 3, hRAGEsec). Em destaque a localização dos polimorfismos em estudo.

Vários trabalhos têm demonstrado que a ligação de AGEs com o receptor RAGE pode resultar em múltiplos efeitos como:

- Disfunção celular do subendotélio e ação proinflamatória (HOFMANN *et al.*, 1999)
- Estresse oxidativo e geração de radicais livres de oxigênio (CHAPPEY *et al.*, 1997),
- Ativação celular do Fator Nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) um marcador de estresse oxidativo (SOUSA *et al.*, 2000). Esta ativação por sua vez induz a expressão de:
  - Fator tecidual procoagulante (YAMAGISHI, *et al.*, 1998),
  - Endotelina-1 vasoconstritora, e
  - Aumento nos níveis da molécula-1 de adesão celular vascular (vascularcellular adhesion molecule-1 (VCAM-1), um marcador de aterosclerose.

Todos os fatores citados podem estar relacionados aos eventos micro e macrovasculares apresentados pelo paciente com diabetes (BONNARDEL-PHU *et al.*, 1999). Vários trabalhos têm relacionado o RAGE como apresentando um papel relevante nas alterações vasculares e inflamatórias do paciente com diabetes (SCHMIDT *et al.*, 1994, HORI, *et al.*, 1996; SCHMIDT 1996; SUN *et al.*, 1998; SCHMIDT, 1998; WAUTIER, 1999; SCHMIDT *et al.*, 1999; SCHMIDT e STERN, 2000).

A administração *in vivo* de RAGE solúvel (sRAGE), que consiste no domínio de ligação extracelular do RAGE, demonstrou suprimir a aterosclerose acelerada em roedores diabéticos (WALTIER, *et al.*, 1996). Portanto a inibição da ligação dos AGEs ao receptor RAGE pode ser um alvo no tratamento da doença aterosclerótica (KISLINGER *et al.*, 1999).

### **2.4.2 Variabilidade genética do receptor RAGE**

Os polimorfismos do gene RAGE são mostrados na Tabela 02 e Figura 07.

O tipo mais comum de variação no DNA genômico é chamado de polimorfismo de um único nucleotídeo ou SNP (*single-nucleotide polymorphism*) e está associado com a diversidade populacional, individualidade, susceptibilidade a doenças e a resposta individual a medicamentos (SHASTRY, 2002).

Tabela 02. Polimorfismos do gene RAGE, adaptado de HUDSON et al (2002).

<b>Polimorfismo</b>	<b>Região</b>	<b>Frequência do alelo menor</b>
-1420 (GTT)n	5' UTR	ND
-1393G>T	5' UTR	ND
-1390G>T	5' UTR	ND
-1202G>A	5' UTR	NA
Deleção-407 a -345 (63Del)	5' UTR	Del <1%
-429T>C	5' UTR	C= 7%
-374T>A	5' UTR	A=19%
Ala2Ala (GCT/GCA)	Exon 1	A=14%
67C>G	Íntron 1	G=17%
Lys37Ser	Exon 2	Ser < 1%
Arg77Cys	Exon 3	Cys < 1%
Gly82Ser	Exon 3	Ser = 5%
Val89Val (GTG/GTC)	Exon 3	C=5%
Gly90Gly (GCT/GCA)	Exon 3	A=5%
718 G>C	Íntron 3	T=8%
Thr187Pro	Exon 6	Pro < 1%
1704G>T	Íntron 7	T=5%
A Ins 1727	Íntron 7	ND
His305Gln	Exon 8	Gln < 1%
Ser307Cys	Exon 8	Cys = 1%
Gly329Arg	Exon 8	Arg < 1%
2117A>G	Íntron 8	ND
2184A>G	Íntron 8	G=16%
2224A>G	Íntron 8	ND
2245G>A	Íntron 8	A=8%
2249A>G	Íntron 8	ND
2741G>A	Íntron 9	ND
Leu363Leu (CTG/TTG)	Exon 10	T=1%
Arg389Gln	Exon 10	Gln < 1%
CA Del 3089	3' UTR	CA Del < 1%

ND = não determinada

UTR: região não traduzida



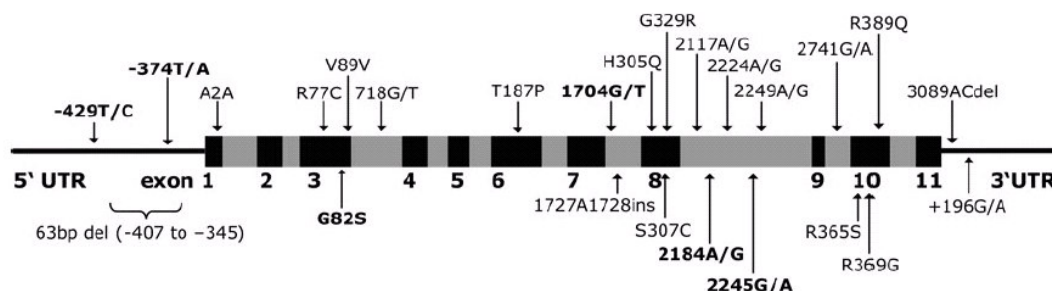


Figura 07. Mapa da localização dos polimorfismos do gene RAGE. Adaptado de Kanková *et al* (2005).

HUDSON *et al.* (1998) descreveram nove sítios polimórficos utilizando a técnica de SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), sendo sete localizados em exons e dois em íntrons. Apenas quatro dos polimorfismos observados levaram a alterações não-sinônimas: Gly82Ser (exon 3), Thr187Pro (exon 6), Gly329Arg (exon 8) e Arg389Gln (exon 10). Destas apenas a substituição glicina por serina no códon 82 (G82S) resulta em alteração de aminoácido funcional. A substituição da glicina na posição 82 pela de serina provoca um aumento de afinidade de RAGE por AGEs. Analisando uma população asiática, os mesmos autores não observaram diferenças significativas nas frequências alélicas entre diabéticos tipo 2 e não diabéticos (90% GG; 10% GS e 0% SS).

Sendo o exon 3 de RAGE a região que contempla o sítio de ligação deste receptor aos diversos ligantes, a mutação G82S (Gly82Ser) RAGE é um alvo importante para a pesquisa..

Por outro lado o polimorfismo G82S do gene RAGE tem sido associado a processos patológicos como a retinopatia em diabéticos tipo 2 asiáticos (KUMARANANICKAVEL *et al.*, 2002), na amplificação da resposta inflamatória e artrite (HOFMAN *et al.*, 2002) e em complicações na pele de diabéticos tipo 2 (KANKOVÁ *et al.*, 1999).

Outra região do gene RAGE cujas mutações estão sendo associadas a patologias é a região promotora. HUDSON *et al.* (2001) descreveram oito novos sítios polimórficos nesta região. Entre estes o polimorfismo -429T>C é particularmente

interessante uma vez que a frequência do alelo C está aumentada no grupo de diabéticos tipo 2 com retinopatia quando comparada com a de controles normais.

Uma fraca associação entre o alelo -1152A e a presença de nefropatia em diabéticos tipo 1 foi descrita por POIRIER *et al.* (2001).

O genótipo AA do polimorfismo -374T>A do RAGE está associado com um controle metabólico inadequado em pacientes diabéticos do tipo 1 com doença cardiovascular e excreção urinária aumentada de albumina, sugerindo uma interação gene-ambiente no desenvolvimento da nefropatia diabética e complicações cardiovasculares (PETTERSON-FERHOLD *et al.*, 2003). Achados semelhantes foram descritos por SANTOS *et al* (2005) que mostraram que o alelo -374A está associado a redução do risco de isquemia em Afro-Brasileiros com diabetes tipo 2. FALCONE *et al* (2004 e 2005) também apontaram que o alelo -374 A em homozigose está associado com menor risco para a doença arterial coronariana e com a severidade da doença coronariana.

As Tabelas 03, 04 e 05 mostram as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos de RAGE e que foram estudados neste trabalho, bem como a sua associação com patologias.

Tabela 03. Frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE reportadas na literatura

Grupo étnico	características	n	Genótipos (%)			Alelo (%)	Comentários
			TT	TC	CC	C	
<b>Brasileiros</b> TORRES, 2007 <sub>2</sub>	Euro-Brasileiros saudáveis	62	75,8	22,6	1,6	12,9	A frequência do alelo C não difere entre Euro- e Afro-Brasileiros.
	Afro-Brasileiros saudáveis	65	77,2	21,4	1,4	12,1	
<b>Brasileiros</b> PICHETH <i>et al</i> 2007.	DM1+	102	64,7	33,3	2,0	19	O alelo C está associado com o DM1 apresentando uma frequência cerca de 2 vezes superior neste grupo quando comparado a controles sem DM1.
<b>Euro-Brasileiros</b> <b>Afro-Brasileiros</b> SANTOS <i>et al</i> , 2005	DM2+	520	77,3	20,6	2,1	12	O alelo -429 C não está associado com a redução de risco para doença cardíaca isquêmica em Afro-Brasileiros.
	DM2+	183	77,0	21,9	1,1	12	
	DM2+DCI+	75	65	35		17	
	DM2+DCI-	56	84	16		10	
<b>Tchecos</b> KANKOVÁ <i>et al</i> , 2005	DM2-	227	69,6	26,4	4,0	17,2	Ausência de associação com nefropatia diabéticos
	DM2+ ND+	198	63,1	29,8	7,1	22	
	DM2+ ND-	179	72,0	25,8	2,2	15,1	
<b>Eslovenos</b> KIRBIS <i>et al</i> , 2004.	DM2- DAC-	241	72,2	26,1	1,7	14,7	Ausência de associação com DM2 ou DAC.
	DM2+ DAC+	168	66	31	3	18,5	
<b>Eslovenos</b> GLOBOCNICK <i>et al</i> , 2003	DM2- RD+	116	73,2	25,9	0,9	13,8	Ausência de associação entre o polimorfismo e retinopatia diabética em DM2.
	DM2+ RD-	70	74,3	25,7	0	12,9	
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> 2001a	DM2+RD+	106	56,6	43,4			Aumento da frequência alelo C associado com retinopatia diabética.
	DM2+RD-	109	73,3	24,7			
	DM2-	113	66,4	33,6			
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> 2001b	DM2+IAM+	51				19	Ausência de associação com doença macrovascular, infarto agudo do miocárdio em DM2+ e não diabéticos.
	DM2+IAM-	107				17	
	DM2-IAM+	160				16	
	CTRL	199				18	
<b>Chineses</b> JIXIONG <i>et al</i> 2003	DM2+R+	205				9,9	Ausência de associação com retinopatia diabética.
	DM2+R-	152				12,2	
	DM2-	212				12,7	
<b>Finlandeses</b> PETERSSON-FERNHOLM <i>et al</i> 2003.	DM1+	996				2	O polimorfismo não está associado com a concentração de Hb glicada..

+: presença; - : ausência

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; CTRL; grupo controle.

NP: nefropatia; IAM: infarto agudo do miocárdio

R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa, DCI: Doença cardíaca isquêmica,

CP: complicações de pele associadas à microangiopatia diabética.

μAlb: microalbuminúria.

DAC: doença arterial coronariana.

Tabela 04. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE reportadas na literatura

			Genótipos (%)			Alelo (%)	
Grupo étnico	características	n	TT	TA	AA	A	Comentários
<b>Euro-Brasileiros</b> <b>Afro-Brasileiros</b> SANTOS <i>et al</i> , 2005	DM2+	520	46,5	40,7	9,3	31	O alelo-374 A esta associado com a redução de risco para doença cardíaca isquêmica em Afro-Brasileiros.
	DM2+	183	52,5	31,7	7,1	24	
	DM2+DCI+	75	71	29		18	
	DM2+DCI-	56	46	54		31	
<b>Brasileiros</b> TORRES, 2007.	Euro-Brasileiros saudáveis	62	38,7	53,2	8,1	35	A frequência do alelo A é significativamente maior em Euro-Brasileiros. A distribuição genotípica difere entre Euro e Afro-Brasileiros.
	Afro-Brasileiros saudáveis	65	60,0	33,8	6,2	23	
<b>Brasileiros</b> HEIDEMANN 2006.	DM1+	102	44,1	47,1	8,8	33	Não observada associação com as concentrações de Hb glicada.
<b>Tchecos</b> KANKOVÁ <i>et al</i> , 2005	DM2-	228	40	50,2	9,8	34,4	Ausência de associação com nefropatia diabética.
	DM2+ ND+	198	42	47	11	37,6	
	DM2+ ND-	179	37	51	12	34,9	
<b>Eslovenos</b> KIRBIS <i>et al</i> , 2004.	DM2- DAC-	241	45,6	43,2	11,2	31,8	Ausência de associação com DM2 ou DAC.
	DM2+ DAC+	168	44,1	48,2	7,7	32,8	
<b>Eslovenos</b> GLOBOCNICK <i>et al</i> , 2003	DM2- RD+	116	43,1	47,4	9,5	33,2	Ausência de associação entre DM2 e retinopatia diabética.
	DM2+ RD-	70	41,4	42,9	15,7	37,1	
<b>Italianos</b> FALCONE <i>et al</i> , 2005	DAC+	234	39,7	51,3	9	34,5	Efeito protetor do alelo A em homozigose sobre o risco de DAC.
<b>Italianos</b> FALCONE <i>et al</i> , 2004	DAC+	175	90,3		9,7		O polimorfismo pode está associado a um efeito protetor do risco coronário.
	DAC-	84	77,4		22,6		
<b>Finlandeses</b> PETTERSSON-FERNHOLM <i>et al</i> 2003.	DM1+ DAC+	85	94	6			O alelo A apresenta uma associação inversa com DAC e IAM. Frequência do alelo A de 13% na amostra total de DM1 (n = 996).
	DM1+ DAC-	872	86	14			
	DM1+IAM+	53	98	2			
	DM1+IAM-	932	86	14			
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> 2001a	DM2+RD+	106	58,5	41,5			Ausência de associação com retinopatia diabética.
	DM2+RD-	109	60,6	39,4			
	DM2-	113	66,5	33,5			
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> 2001b	DM2+IAM+	51				17	Ausência de associação com doença macrovascular, infarto agudo do miocárdio em DM2+ e não diabéticos.
	DM2+IAM-	107				19	
	DM2-IAM+	160				22	
	CTRL	199				20	
<b>Chineses</b> JIXIONG <i>et al</i> 2003	DM2+R+	205				13,6	Ausência de associação com retinopatia diabética.
	DM2-R+	152				12,7	
	DM2-	212				13,9	

+: presença; -: ausência; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; CTRL; grupo controle; NP: nefropatia; IAM: infarto agudo do miocárdio; R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa, DCI: Doença cardíaca isquêmica; CP: complicações de pele associadas à microangiopatia diabética; µAlb: microalbuminúria; DAC: doença arterial coronariana.

Tabela 05. Frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo G82S da região do exon 3 do gene RAGE reportadas na literatura

			Genótipos (%)			Alelos (%)	
Grupo étnico	Grupos	n	GG	GS	SS	S	Comentários
<b>Asiáticos</b>	DM2–	156	90	10	0	8	Diabéticos com ou sem doença macrovascular não diferem.
<b>Ingleses</b>	DM2–	196	87	12	1	6	
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> , 1998	DM2+	258	93	7	0	4	
<b>Tchecos</b>	CTRL	90	100	0	0	0	Alelo S está associado com manifestações de pele da microangiopatia e de forma marginal com a <i>psoríase vulgaris</i> .
KANKOVÁ <i>et al</i> , 1999	DM2+ CP+	88	89,8	10,2	0	5,1	
	DM2+ RP+	49	95,9	4,1	0	2,4	
	Psoríase	142	94,4	5,6	0	2,8	
<b>Chineses</b>	DM2–	104	56,7	40,4	2,9	23,1	Sem diferenças associadas ao diabetes com microalbuminúria ou microangiopatia.
LIU <i>et al</i> , 1999.	DM2+	156	66,2	32,3	1,5	17,7	
<b>Finlandeses</b>	DM2– CAD+	308	88	12	0	6	G82S não está associado como fator de risco para DAC+ na presença ou ausência de DM2.
PULKKINEN <i>et al</i> , 2000.	DM2+ CAD+	206	85	15	0	7	
	CTRL	82	97	7	0	4	
<b>Dinamarqueses</b>	DM1+ NP+	199	93,6	5,9	0,5	3,5	Não observada associação com G82S.
POIRIER <i>et al</i> , 2001	DM1+ NP–	193	90,6	9,4	0	4,7	
<b>Indianos</b>	DM2+ R+	100	91	7	2	5,5	O alelo S está associado a menor risco de desenvolvimento de retinopatia em DM2 em indianos asiáticos.
KUMARAMAN ICKAVEL <i>et al</i> , 2002	DM2+ R–	100	80	18	2	11	
	CTRL	50	98	2	0	2	
<b>Japoneses</b>	DM2+ µAlb+	116	74	23	3	14,2	Alelo S não está associado a presença de microalbuminúria em DM2 Japoneses.
YOSHIOKA <i>et al</i> , 2005 a	DM2+ µAlb–	232	79	18	3	12,3	
<b>Brasileiros</b>	CTRL	82	96,3	3,7	0	1,8	Ausência de associação entre o alelo S e DM1 e DM2 em população brasileira.
NAKA <i>et al</i> , 2006.	DM2+	147	97,9	2,1	0	1,0	
	DM1+	105	98,1	1,9	0	1,0	
<b>Brasileiros</b>	Euro-Brasileiros Saudáveis	62	95,2	4,8	0	2,4	Não há diferença significativa genotípica ou alélica entre Euro- e Afro-Brasileiros.
TORRES, <i>et al</i> 2007.	Afro-Brasileiros Saudáveis	70	98,6	1,4	0	0,7	
<b>Norte Americanos</b>	DM2+ DAC+	99	91,1	8,9			Alelo S não está associado à doença cardiovascular, infarto do miocárdio e doença isquêmica.
HOFMANN <i>et al</i> , 2005	DM2+ DAC–	110	93,2	6,8			
	DM2– DAC+	93	94	6			
	DM2– DAC–	1270	91,9	8,1			

+: presença; – : ausência; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; CTRL; grupo controle; NP: nefropatia; R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa; CP: complicações de pele associadas à microangiopatia diabética; µAlb: microalbuminúria; DAC: doença arterial coronariana.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Associar as concentrações séricas dos AGEs e a variabilidade do gene RAGE para o exon 3 e região promotora com marcadores bioquímicos para controle da glicemia e marcadores de risco para doença arterial coronária em pacientes com diabetes e doença arterial coronariana.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- 3.2.1 Determinar a concentração dos produtos de glicação avançada (AGEs) em amostras biológicas;
- 3.2.2 Determinar a variabilidade do exon 3 e da região promotora do gene do receptor para os produtos de glicação avançada (RAGE), utilizando PCR-RFLP, SSCP e seqüenciamento de DNA;
- 3.2.3 Correlacionar a variabilidade genética em estudo com as concentrações séricas de AGEs e com marcadores de risco para doença arterial coronária;
- 3.2.4 Avaliar a possibilidade de uso diagnóstico dos polimorfismos de RAGE como marcadores de risco para diabetes e doença arterial coronária.

## **4. Material e Métodos**

O projeto de pesquisa desta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Protocolo CEP-HC N° 071.EXT.025/2003-02).

### **4.1 Amostra**

Foram coletadas amostras de sangue de 320 pacientes submetidos à cineangiocoronariografia e/ou cateterismo nos serviços de hemodinâmica do Hospital de Clínicas da UFPR (9 % do total) e no Hospital Cardiológico Costantini (91 % do total). As amostras foram coletadas imediatamente antes de iniciar a cineangiocoronariografia pelo médico que conduziu o procedimento. Os pacientes estavam em jejum de 8 a 12 horas. Os dados clínicos e antropométricos foram obtidos dos laudos dos procedimentos e das informações do prontuário. O Anexo 1 mostra a planilha utilizada na coleta de dados. A caracterização da etnia foi feita por observação fenotípica dos pacientes.

#### **4.1.1 Classificação da amostra e critérios diagnósticos**

A amostra em estudo foi subdividida em três grupos designados como: grupo controle (CTRL), grupo diabéticos tipo 2 associado com doença arterial coronariana (DM2+DAC+) e grupo com doença arterial coronariana (DAC+) sem a presença associada de diabetes tipo 2 (DAC+).

A presença de doença arterial coronariana foi definida angiograficamente pela presença de estenose maior ou igual a 50% em qualquer das artérias coronárias, como preconizado por RINGQVIST *et al.* (1987). A severidade da DAC foi estimada através de dois processos: a contagem do número de artérias coronárias principais (variando de 1 a 4) com estenose  $\geq 50\%$ , e pelo índice de Duke (SMITH *et al.* 1991). O índice prognóstico de Duke considera o número de artérias coronárias principais lesadas bem

como o envolvimento da principal artéria coronária esquerda (tronco) e o envolvimento da coronária descendente anterior esquerda, especialmente quando o segmento proximal apresenta estenose severa ( $\geq 95\%$ ). O índice de Duke varia de zero a 100, sendo que a pontuação (*score*) zero representa a ausência de doença arterial coronariana, também definido como angiografia “normal” ou “cateterismo branco”, e a pontuação de 100 representando a condição de DAC mais severa. O Anexo 2 apresenta os critérios e os *scores* utilizados na obtenção do índice de Duke.

Os resultados dos procedimentos angiográficos foram obtidos dos laudos dos pacientes e a interpretação e análises da severidade da doença cardiovascular foram conduzidas com auxílio do corpo clínico do setor de Hemodinâmica do Hospital Costantini, sob a coordenação do médico Costantino O. Costantini.

O *Diabetes mellitus* foi caracterizado utilizando os critérios da Associação Americana de Diabetes (critérios 2007). Em síntese, glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dL em mais de uma ocasião ou teste oral de tolerância a glicose com 75g de sobrecarga apresentando glicemia superior a 200 mg/dL após 2 horas a tomada da dose. Foram considerados também para a caracterização do diabetes a história clínica dos pacientes em uso de drogas hipoglicemiantes e a concentração de hemoglobina glicada ( $HbA_{1C}$ ) maior que 7,0%. Foi considerado como euglicemia as concentrações de glicose de 60 a 99 mg/dL no soro de pacientes em jejum. Pacientes com glicemia em jejum  $\geq 100$  e  $< 126$  mg/dL, sem outras características para diabetes foram excluídos do estudo.

Foram excluídos os pacientes que apresentavam doença hepática severa, insuficiência ou doença pulmonar, acidente vascular cerebral ou insuficiência renal severa (creatinina  $\geq 2,5$  mg/dL).

A Tabela 06 sumariza os critérios para a classificação da amostra e o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos pacientes que participaram deste projeto encontra-se no anexo 3.



Tabela 06. Critérios para a classificação da amostra.

Grupos	n	Angiografia	status glicêmico
Controle (CTRL)	81	Estenose < 50% em todas as artérias coronárias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicemia de jejum &lt; 99 mg/dL</li> <li>• HbA<sub>1C</sub> &lt; 6,5%</li> <li>• Histórico clínico para diabetes negativo</li> </ul>
Presença de doença arterial coronariana sem diabetes (DAC+)	148	Estenose ≥ 50% em qualquer coronária	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicemia de jejum &lt; 99 mg/dL</li> <li>• HbA<sub>1C</sub> &lt; 6,5%</li> <li>• Histórico clínico para diabetes negativo</li> </ul>
Diabéticos tipo 2 com DAC (DM2+DAC+)	91	Estenose ≥ 50% em qualquer coronária	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glicemia de jejum &gt; 126 mg/dL</li> <li>• TOTG (75 g) 2 h &gt; 200 mg/dL</li> <li>• História clínica de diabetes positiva</li> <li>• HbA<sub>1C</sub> &gt; 7,0%</li> <li>• Uso de hipoglicemiantes</li> </ul>

TOTG: teste oral de tolerância à glicose  
HbA<sub>1C</sub>: hemoglobina glicada A<sub>1C</sub>

A dislipidemia foi caracterizada, a presença de concentrações séricas de colesterol superiores a 200 mg/dL e/ou triglicérides superiores a 150 mg/dL, ou quando o paciente estava em uso de medicamentos hipolipemiantes (IV Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2007).

A história familiar positiva para doença arterial coronariana foi definida como a presença de evento coronariano no pai antes dos 55 anos de idade e na mãe antes dos 65 anos (IV Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2007).

A presença de hipertensão arterial foi considerada quando os valores medidos superaram 140/90 mmHg ou com o paciente estava submetido à terapia anti-hipertensiva.

Foram considerados tabagistas aqueles que faziam uso regular de qualquer número de cigarros, ex-tabagistas aqueles que abandonaram o uso do tabaco há mais de seis meses e não-tabagistas aqueles que nunca fizeram uso regular do fumo.

O índice de massa corpórea (IMC) foi obtido pela razão entre o peso em kg e o quadrado da altura medida em metros (kg/m<sup>2</sup>).

#### 4.1.2 Amostras de diabéticos tipo 1.

Também foram estudados os polimorfismos da região promotora e do exon 3 de 105 indivíduos apresentando *Diabetes mellitus* tipo 1. Esta amostra foi coleta pela Profa Dra. Vânia M. Alcântara do Departamento de Patologia Médica da UFPR (Comitê de Ética CEP-HC nº 327.037/2001-04). O DNA de sangue total foi extraído no Departamento de Genética da UFPR e alíquotas foram gentilmente cedidas pela Profa Dra. Eleidi A. Chautard Freire Maia. Os indivíduos pertencentes a este grupo (75% Euro-Brasileiros e 35% Afro-brasileiros, 41 homens e 64 mulheres), não tinham evidências de retinopatia no exame clínico ou insuficiência renal manifesta (creatinina sérica <2,5 mg/dL). A idade média foi  $24,3 \pm 7,1$  anos. A concentração de HbA<sub>1C</sub> e glicemia em jejum foram, respectivamente,  $9,6\% \pm 2,5\%$  e  $217,8 \pm 113,4$  mg/dL. Como os pacientes desta amostra não foram avaliados angiograficamente as análises foram limitadas aos polimorfismos em estudo e presença de *Diabetes mellitus* tipo 1 (NAKA *et al*, 2006 e HEIDEMANN 2007).

#### 4.2 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído do sangue total coletado na presença de EDTA tripotássico (Vacutainer, BD) utilizando o procedimento descrito por LAHIRI e NURNBERGER (1991). Esta técnica, adaptada para um volume de sangue de 1 mL e com as modificações implementadas, encontra-se descrita em detalhes no anexo 4.

A qualidade do DNA e sua quantificação foram determinadas pela medida espectrofotométrica de uma diluição 1:100 em água reagente tipo 1 nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Foram consideradas adequadas amostras com razão entre as absorbâncias 260nm/280nm entre 1,6 e 2,0. Para aquelas amostras que não atingiram este critério, o DNA foi novamente precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e o precipitado lavado com etanol 70%, até que a amostra atingisse o critério estabelecido. As concentrações de DNA (média e desvio padrão) obtidas foram de  $255 \pm 35,6$  ng/μL

com amplitude de variação de 105 a 875 ng/ $\mu$ L. Para uso as concentrações das amostras foram normalizadas para 100 ng/ $\mu$ L e mantidas em geladeira a 4°C ou estocadas em freezer a -20°C.

#### **4.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

Para a identificação das regiões polimórficas do gene RAGE, uma parte da região promotora e do exon 3 foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores complementares à região promotora foram sintetizados (Alpha-DNA LTDA) como descritos por HUDSON et al 2001 e possibilitam a amplificação da região -590 a -246 pb gerando um amplicon de 344 pb. Para a amplificação da região do exon 3 foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por KANKOVÁ et al 2001 e sintetizados pela Invitrogen. Estes permitem a amplificação da região compreendida entre os nucleotídeos 7007 e 7402 (SUGAYA *et al* 1998; D28769 GenBank) sob o número, correspondente ao intron 2, exon 3 e parte do intron 3, gerando um produto de PCR de 397 pb. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25  $\mu$ L e as condições otimizadas estão descritas na Tabela 07.

Tabela 07. Condições para reação de PCR para amplificação das regiões polimórficas do gene RAGE em estudo

Reagentes	Região Promotora		Exon 3	
Oligonucleotídeos iniciadores	PROM-F-5'-GGG GGC AGT TCT CTC CT-3'		E3-F-5'-GTA AGC GGG GCT CCT GTT GCA-3'	
	PROM-R-5'-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-3'		E3-R-5'-GGC CAA GGC TGG GGT TGA AGG-3'	
	Concentração final (volumes para reação de 25µL)			
Oligonucleotídeos iniciadores (10 pmol/µL cada)	10,0 pmol, cada	(2,5 µL)	5,0 pmol, cada	(1,25 µL)
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	(2,5 µL)	10 ng/µL	(2,5 µL)
Tampão Taq 10X	1 X	(2,5 µL)	1 X	(2,5 µL)
dNTP 5 mM	0,2 mM	(1 µL)	0,2 mM	(1 µL)
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2,0 mM	(1,0 µL)	1,5 mM	(0,75 µL)
Água reagente estéril	qs 25 µL	(14,7 µL)	qs 25 µL	(16,2 µL)
Taq DNA polimerase (5U/µL)	4 U	(0,8 µL)	4 U	(0,8 µL)
Ciclo térmico	1 ciclo: 94°C → 2 min		1 ciclo: 94°C → 3 min	
	34 ciclos:		34 ciclos:	
	94°C → 1 min		94°C → 40 s	
	58°C → 1 min		68°C → 40 s	
	72°C → 1 mim		72°C → 45 s	
	1 ciclo: 72°C → 10 mim		1 ciclo: 72°C → 10 mim	

Tampão *Taq* 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em agarose 1,2% em tampão TBE 1X. Para isto foram aplicados 2µL do produto de PCR + 3 µL da mistura do tampão de aplicação (*loading dye*: glicerol 30% v/v contendo 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol). Para a visualização do produto de PCR o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultra-violeta (302 nm) e fotodocumentado utilizando câmara CCD (Biochemi, UVP LTDA). Este procedimento eletroforético foi realizado como primeira triagem para a detecção da deleção de 63 pares de base (63 Del) da região promotora. As amostras com migração

eletroforética anômalas foram submetidas a nova eletroforese utilizando agarose a 2%, mantendo as demais condições para confirmar a presença da 63Del.

#### 4.4 Reações de RFLP

As reações para a detecção de polimorfismos de comprimento de restrição (RFLP) foram realizadas utilizando as enzimas *Alu* I (Invitrogen) e *Tsp* 509 I (New England BioLabs). Os protocolos de reação são apresentados na Tabela 08.

Tabela 08. Protocolos de detecção dos polimorfismos do gene RAGE por PCR-RFLP.

Reagentes	<i>polimorfismos</i>		
	-429T>C	-374T>A	G82S
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,0 μL	1,25 μL	1,0 μL
Tampão (10X concentrado)	0,5 μL (1X)*	0,5 μL (1X)**	0,5 μL (1X)*
Água ultra-pura estéril	3,4 μL	3,13 μL	3,4 μL
Enzima de restrição (10U/μL)	0,1 μL (1U) <i>Alu</i> I	0,125 μL (1,25U) <i>Tsp</i> 509I	0,1 μL (1 U) <i>Alu</i> I
Temperatura de incubação	37° C	65°C	37° C
<i>Tempo de incubação</i>	<i>16 h</i>	<i>16 h</i>	8 h

\* Tampão 10 X REact 1 (Invitrogen): 500 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0 a 37°C.

\*\* Tampão 10X NEBuffer (New England BioLabs): 100 mM Bis Tris Propano-HCl; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM ditiotreitol, pH 7,0 a 25°C

Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%, em tampão TBE 1X (SAMBROOK *et al* 1989). Ao volume total da reação de restrição (5 μL) foram adicionados 3 μL de “loading dye” e aplicado no gel de poliacrilamida. A coloração foi realizada com brometo de etídeo

(0,5µg/mL) e visualizada sob luz ultra-violeta (302 nm). O gel foi fotodocumentado com câmara CCD (Biochemi, UVP LTD).

#### **4.5 Reações de SSCP**

As análises para identificação de polimorfismos conformacionais de fita simples foram conduzidas pelo procedimento descrito por SAMBROOK et al (1989) com modificações. Em cônicos tubos para PCR de 200 µL, foram adicionados 10 µL de tampão de formamida (formamida 95%; 20 mM de EDTA e 0,025% azul de bromofenol e xileno cianol) e 5 µL de produto de PCR (região promotora ou exon 3). A mistura foi incubada a 98°C por 10 minutos para desnaturação e imediatamente resfriada em gelo. Todo o volume foi aplicado em gel de acrilamida (29:1; 8 ou 10%) contendo 10% de glicerol e tamponado com TBE 1X. A corrida eletroforética foi desenvolvida com TBE 1X a 200V na temperatura ambiente ou geladeira (4-8°C) até que ambos os corantes deixassem o gel (cerca de 16 horas). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) ou SYBR Gold (1:10000 em tampão fosfato 10 mM pH 7,0). As imagens foram obtidas com câmera CCD (Biochemi, UVP LTDA). O preparo dos géis e as condições de ensaio encontram-se na Tabela 09.

Tabela 09. Preparo dos géis e condições de ensaio para reação de SSCP.

<b>Reagentes</b>	<b>promotor</b>	<b>exon3</b>
Concentração do gel	10%	8%
Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 Solução 40% (GE)	11,3 mL	9 mL
TBE 10X	4,5 mL	4,5 mL
Glicerol 50% v/v	9 mL	9 mL
Água tipo 1 ultra-pura	qs 45mL (20,2mL)	qs 45 mL (22,5 mL)
Persulfato de potássio 10% p/v	300 µL	300 µL
TEMED	40 µL	40 µL
Condições de ensaio		
Pré-corrida	Sim (20 mim 150 V)	Não
Tampão de corrida	TBE 1X	TBE 1X
Corrente	200 V, 25mA por gel	250 V; 35mA por gel
Temperatura	ambiente	Geladeira (4 – 8 °C)
Tempo	~16 horas	~ 18 horas

#### 4.6 Sequenciamento de produtos de PCR

A reação de sequenciamento de DNA foi realizada utilizando o sistema ET terminator (GE Healthcare) que utiliza didesoxirribonucleotídeos acoplados a cromóforos fluorescentes. Os produtos das reações foram analisados em sequenciador automático modelo 377 (Applied Biosystems).

##### 4.6.1 Remoção dos oligonucleotídeos iniciadores dos produtos de PCR

A alíquotas (6 µL) do produto de PCR (30 a 50 ng) foram adicionados 0,33 µL (3,3U) de Exonuclease I (GE Health Care, 10 U/µL), 0,33 µL (0,66U) de SAP (*Shrimp*

*Alkaline Phosphatase*, GE Health Care, 2 U/ $\mu$ L) e 0,34  $\mu$ L de água ultra-pura estéril. O sistema de reação foi incubado em termociclador a 37°C por 30 minutos, seguidos de 15 minutos a 80°C para inativação das enzimas.

#### **4.6.2 Reação de seqüenciamento**

A 2 $\mu$ L (~15 ng) do produto de PCR livre de iniciadores foram adicionados 1  $\mu$ L do oligonucleotídeo iniciador F ou R (10 pmol/ $\mu$ L), 3  $\mu$ L de água ultra-pura estéril e 4  $\mu$ L do reagente ET. O sistema de reação foi levado ao termociclador programado para 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos na temperatura de anelamento (58°C para a região do promotor e 68°C para a região do exon 3) e 60 segundos a 60°C.

#### **4.6.3 Purificação dos produtos da reação de seqüenciamento**

Ao volume total da reação de seqüenciamento (10  $\mu$ L) foram adicionados 30  $\mu$ L água ultra-pura estéril e 60  $\mu$ L de isopropanol. Após mistura em vórtex, a reação foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugada a 13000 rpm por 25 minutos. O precipitado da reação foi lavado com 250  $\mu$ L de etanol 70%, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante por aspiração, o precipitado foi seco a vácuo (~10 minutos). As amostras foram solubilizadas em 5  $\mu$ L de formamida e aplicadas (1 ou 2  $\mu$ L) no gel de seqüenciamento.

### **4.7 Quantificação dos Produtos de Glicação Avançada**

Os AGEs foram quantificados pela medida da fluorescência como descrito por ZILIN et al 2001. As amostras de soro foram diluídas 1:51 (60  $\mu$ L soro + 3,0 mL diluente) com PBS (tampão fosfato salina, pH 7,4). O espectrofluorímetro (Spectrofluorophotometer, RF 5301 PC, Shimadzu) foi ajustado nos comprimentos de onda de 350 nm (excitação) e 440 nm (emissão) com abertura de fenda de 5 nm. As



medidas foram realizadas à temperatura ambiente (20 – 25°C) em cubeta de 1 cm de caminho ótico. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Os resultados foram obtidos em intensidade de fluorescência relativa expresso em unidade arbitrária (UA) corrigida pela diluição. Os valores de concentração de AGEs fluorescentes, foram expressos em UA específica, dividindo o valor obtido da fluorescência em UA pela concentração de proteínas totais do soro (g/mL). As proteínas foram quantificadas pelo método do biureto. Este procedimento permite expressar os AGEs fluorescentes em UA/g de proteína sérica. Ensaio de imprecisão analítica (n=20) mostraram um coeficiente de variação intraensaio de 6,8%.

#### **4.8 Quantificações dos parâmetros bioquímicos**

As determinações de glicose, colesterol total, triglicérides, creatinina, ácido úrico, proteínas totais e albumina foram realizadas no soro, utilizando um sistema automatizado de química seca, com reagentes, calibradores, controles e protocolos fornecidos pelo fabricante (Vitros 950, Johnson & Johnson).

As determinações de HDL-colesterol e LDL-colesterol foram realizadas por ensaio homogêneo utilizando reagentes e calibradores Roche (Roche Diagnostica LTDA) em analisador automático (Hitachi 912, Roche). As determinações de apolipoproteína A<sub>I</sub> e apolipoproteína B foram também realizadas com reagentes Roche no analisador Hitachi 912, utilizando metodologia imunoturbidimétrica.

As razões colesterol total/HDL-C (índice de Castelli 1), HDL-C/LDL-C (índice de Castelli 2) e a razão ApoA/ApoB foram calculadas (CASTELLI *et al*, 1983). O índice aterogênico do soro, definido como o logaritmo da razão entre as concentrações de triglicérides (TG) e HDL-colesterol ( $\log(\text{TG}/\text{HDL})$ ) foi calculado e analisado como proposto por DOBIASOVA *et al* (2001).

A determinação da hemoglobina glicada A<sub>1C</sub> (HbA<sub>1C</sub>) foi realizada através de cromatografia de troca iônica em sistema automatizado de cromatografia líquida de

alta performance HPLC-Variant (Bio-Rad) utilizando padrões e controles fornecidos pelo fabricante do sistema.

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba.

#### **4.9 Análises estatísticas**

As comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras não-pareadas ou pela análise de variância (ANOVA). A variável triglicérides, que não apresenta distribuição normal foi normalizada por transformação logarítmica. As concentrações de AGEs foram analisadas pelo teste U de Mann-Whitney. Para as variáveis descontínuas foram utilizados os testes de Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) ou Teste Exato de Fischer bidirecional. As análises de correlação utilizaram o modelo descrito por Pearson (correlação linear).

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem dos genótipos e os cálculos de frequências alélicas e desequilíbrio de ligação foram realizadas com o programa ARLEQUIM versão 2.0. Os pacotes estatísticos Statistica para Windows versão 5.5 (StatSoft, Tulsa, CA), RxC (Miller 1999) foram utilizados nas análises. Uma probabilidade (P) inferior a 0,05 foi considerada significativa em todas as análises

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização da amostra

A amostra em estudo foi composta por 320 indivíduos sendo 95,1% Euro-brasileiros e 4,9% Afro-Brasileiros. As características demográficas e clínicas da amostra, separada nos grupos em estudo, encontram-se na Tabela 10.

Os valores de média (M), desvio padrão (DP) e amplitude de variação (AV) para os analitos em estudo são mostrados nas Tabelas 11 e 12, separados conforme os grupos em estudo.

Os resultados das análises angiográficas estão mostradas na Tabela 13. Sendo que *bypass* representa o número de indivíduos que receberam implantes de ponte de safena e/ou mamária, *stent* a presença do extensor convencional ou com medicamento.

Tabela 10. Características demográficas e clínicas da amostra.

<b>Características</b>	<b>CTRL n=81</b>	<b>DM2+DAC+ n=91</b>	<b>P*</b>	<b>DAC+ n=148</b>	<b>P**</b>	<b>P***</b>
Sexo M/F (n) <sup>2</sup>	36/45	52/39	0,10	108/40	<b><u>&lt;0,001</u></b>	<b><u>0,01</u></b>
Raça Euro/Afro (%) <sup>3</sup>	95,1/4,9	91,2/8,8	0,38	97,3/2,7	0,45	0,06
Idade (anos) <sup>1</sup>	58,4±10,0	64,6±9,1	<b><u>&lt;0,001</u></b>	63,2±11,0	<b>0,001</b>	0,33
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	24,6±3,2	27,8±4,6	<b><u>&lt;0,001</u></b>	25,9 ± 3,5	<b><u>&lt;0,001</u></b>	<b><u>&lt;0,001</u></b>
Pressão sistólica (mmHg) <sup>1</sup>	140,4±20,7	146,1±21,2	0,08	144,7±19,7	0,13	0,61
Pressão diastólica (mmHg) <sup>1</sup>	80,7±8,8	80,0±8,6	0,60	79,9±8,5	0,51	0,94
Hipertensão arterial (%) <sup>2</sup>	61,7	43,9	<b><u>0,02</u></b>	41,2	<b><u>0,03</u></b>	0,66
Tabagismo <sup>3</sup> sim (%)	60,5	49,5		41,2		
Ex-tabagista (%)	27,7	39,5		39,8		
Não (%)	14,8	11,0	0,17	19,0	<b><u>0,03</u></b>	0,21
Dislipidemia (%) <sup>2</sup>	39,5	50,5	0,14	50,0	0,13	0,93
História familiar para DAC (%) <sup>2</sup>	38,3	41,7	0,63	43,2	0,47	0,82

1. teste “t” amostras não pareadas; 2. Teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ ); 3. Teste exato de Fisher bidirecional

P\*. Comparação entre CTRL e DM2+DAC+

P\*\*. Comparação entre CTRL e DAC+

P\*\*\*. Comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

Tabela 11. Média, desvio padrão (M ± DP) e amplitude de variação (AV) para o perfil lipídico e indicadores de risco para DAC nos grupos em estudo.

Analitos	Grupo CTRL		Grupo DM2+DAC+			Grupo DAC+			P***
	M±DP	AV	M±DP	AV	P*	M ± DP	AV	P**	
Colesterol total (mg/dL)	175,6±33,7	114-290	170,8±40,7	93– 403	0,41	164,5±37,1	74 - 295	<b><u>0,03</u></b>	0,21
HDL-C (mg/dL)	46,9±12,6	24-78	39,2±10,1	12-68	<b><u>≤0,001</u></b>	41,2±10,2	20 - 69	<b><u>≤0,001</u></b>	0,12
LDL-C (mg/dL)	119,5±27,5	52-192	111,1±30,6	45,9–201	0,06	109,6±34,8	29 - 257	<b><u>0,03</u></b>	0,73
Triglicérides (mg/dL) <sup>†</sup>	110,6±62,7	31-418	162,7±101,2	51-588	<b><u>≤0,001</u></b>	126,7±70,6	31 - 571	<b><u>0,03</u></b>	<b><u>≤0,001</u></b>
Apo AI (mg/dL)	120,1±25,8	74-178	112,3±27,0	27–176	0,057	112,6±23,7	58 - 184	<b><u>0,03</u></b>	0,92
Apo B (mg/dL)	89,7±23,0	40-163	91,6±26,2	44-163	0,61	86,3±26,4	19 - 184	0,32	0,12
Log(TG/HDL-C)	0,34±0,29	-0,37–1,10	0,57±0,27	-0,06–1,22	<b><u>≤0,001</u></b>	0,45±0,26	-0,15–1,2	<b><u>0,005</u></b>	<b><u>≤ 0,001</u></b>
Colesterol/HDL-C	4,3±2,8	1,7-25,8	4,6±1,8	2,2–14,1	0,32	4,2±1,4	1,8–9,2	0,73	<b><u>0,03</u></b>
LDL-C/HDL-C	2,9±2,0	0,76–18,3	3,0±1,2	1,2–8,0	0,82	2,8±1,2	0,7–8,0	0,48	0,19
ApoAI/ApoB	1,4±0,47	0,6–3,1	1,3±0,4	0,3–2,8	0,13	1,5±0,78	0,39–6,8	0,58	0,07

Comparações pelo teste “t” amostras não pareadas

<sup>†</sup> Teste “t” com amostra logaritmicamente transformada

P\*. Comparação entre CTRL e DM2+DAC+

P\*\*. Comparação entre CTRL e DAC+

P\*\*\*. Comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

Tabela 12. Média, desvio padrão ( $M \pm DP$ ) e amplitude de variação (AV) para marcadores do controle glicêmico, função renal, proteínas e AGEs fluorescentes (F-AGEs) grupos em estudo.

Analitos	Grupo CTRL		Grupo DM2+DAC+			Grupo DAC+			
	<b>M<math>\pm</math>DP</b>	<b>AV</b>	<b>M<math>\pm</math>DP</b>	<b>AV</b>	<b>P*</b>	<b>M <math>\pm</math> DP</b>	<b>AV</b>	<b>P**</b>	
HbA <sub>1C</sub> (%)	5,2 $\pm$ 0,65	2,6–6,4	7,6 $\pm$ 1,6	5,1–12,4	<b><u><math>\leq 0,001</math></u></b>	5,4 $\pm$ 0,5	3–6,6	0,09	<b><u><math>\leq 0,001</math></u></b>
Glicose (mg/dL)	89,9 $\pm$ 11,0	71-116	154,7 $\pm$ 61,7	78-340	<b><u><math>\leq 0,001</math></u></b>	91,1 $\pm$ 12,0	54-127	0,43	<b><u><math>\leq 0,001</math></u></b>
Creatinina (mg/dL)	0,86 $\pm$ 0,28	0,5–2,5	1,00 $\pm$ 0,37	0,5–2,7	<b><u>0,009</u></b>	0,99 $\pm$ 0,41	0,5 – 2,8	<b><u>0,01</u></b>	0,95
Ácido Úrico (mg/dL)	5,4 $\pm$ 1,6	2,4–9,7	6,2 $\pm$ 2,1	2,7–14,7	<b><u>0,006</u></b>	6,0 $\pm$ 1,6	2,6 - 11	<b><u>0,01</u></b>	0,32
Proteínas totais (g/dL)	6,6 $\pm$ 0,7	4,9 – 8,7	6,6 $\pm$ 0,6	5,2–8,9	0,69	6,5 $\pm$ 0,7	4,5 – 8,2	0,17	0,31
Albumina (g/dL)	3,5 $\pm$ 0,5	1,9–4,6	3,5 $\pm$ 0,5	1,9–5,2	0,76	3,4 $\pm$ 0,5	1,8 – 5,0	0,50	0,72
F-AGEs $\times 10^6$ (UA/g proteína) <sup>§</sup>	55,3 $\pm$ 13,1	31-118	64,4 $\pm$ 16,7	30–112	<b><u><math>\leq 0,001</math></u></b>	63,5 $\pm$ 19,0	32-157	<b><u>0,001</u></b>	0,28

Comparações pelo teste “t” amostras não pareadas

<sup>§</sup>Teste U de Mann-Whitney

P\*. Comparação entre CTRL e DM2+DAC+

P\*\*. Comparação entre CTRL e DAC+

P\*\*\*. Comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

Tabela 13. Características angiográficas da amostra

Parâmetros		CTRL	DM2+DAC+	DAC+	P*
Sem Intervenção (%) <sup>1</sup>		0	60,4	53,4	0,28
bypass/stent/ambos (%) <sup>3</sup>		0	14,4/20,8/4,4	23,6/19,6/3,4	0,16
Índice de Duke (M ± DP) <sup>2</sup>		0	46,8±20,3	46,2±18,9	0,81
Vasos lesados (M ± DP) <sup>2</sup>		0	2,39± 1,3	2,23±1,0	0,25
Número de Vasos lesados, n(%) <sup>3</sup>	1	0	22 (24,2)	44 (29,7)	0,37
	2	0	31 (34,0)	45 (30,4)	
	3	0	38 (41,8)	59 (32,5)	

P\*. Comparação entre os grupos DM2+DAC+ e DAC+.

M±DP. Média ± desvio padrão.

1. Teste do Chi-quadrado;

2. Teste “t”

3. Teste exato de Fisher bidirecional (RxC).

## 5.2 Análises de PCR-RFLP

Os mapas de restrição e perfis eletroforéticos característicos da reação de PCR-RFLP para os polimorfismos em estudo, estão mostrados nas Figuras 08 a 11.

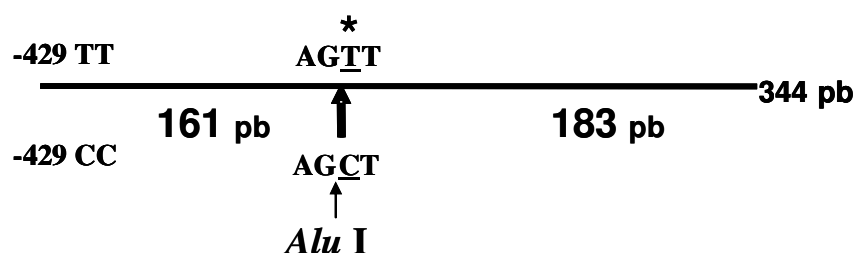


Figura 08-A. Mapa de restrição da região promotora do gene RAGE com a enzima *Alu I* (AG↓CT). No mutante substituição do nucleotídeo timina (T) por citosina (C) cria sítio de restrição que permite diferenciar os genótipos. As setas indicam os sítios de clivagem.

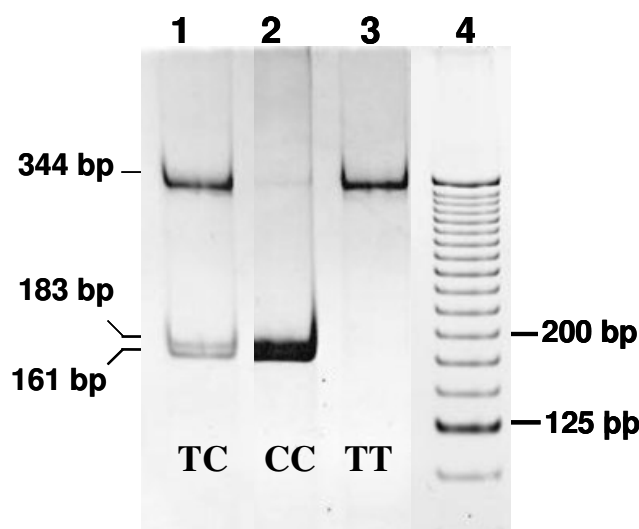


Figura 08-B. Perfil eletroforético dos produtos PCR-RFLP (344 pb) da região promotora do gene RAGE submetidos à clivagem com a enzima *Alu I*.

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm).

As linhas 1, 2 e 3 mostram respectivamente os perfis de restrição para os genótipos -429TC, -429 CC e -429TT. A linha 4 mostra o marcador de massa molecular de 25 pb. À esquerda do gel está indicado o tamanho molecular dos fragmentos obtidos.



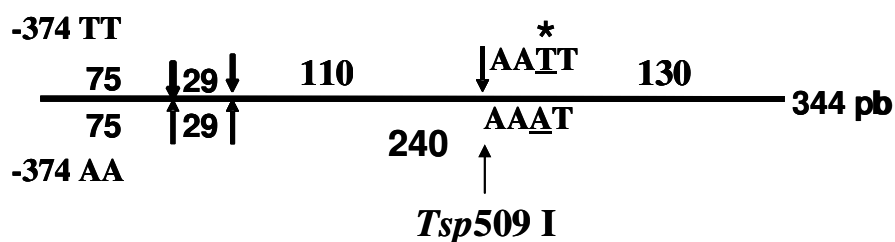


Figura 09-A. Mapa de restrição da região promotora do gene RAGE com a enzima *Tsp 509 I* (↓AATT). No mutante uma substituição no nucleotídeo timina (T) por adenina (A) cria sítio de restrição que permite diferenciar os genótipos. As setas indicam os sítios de clivagem

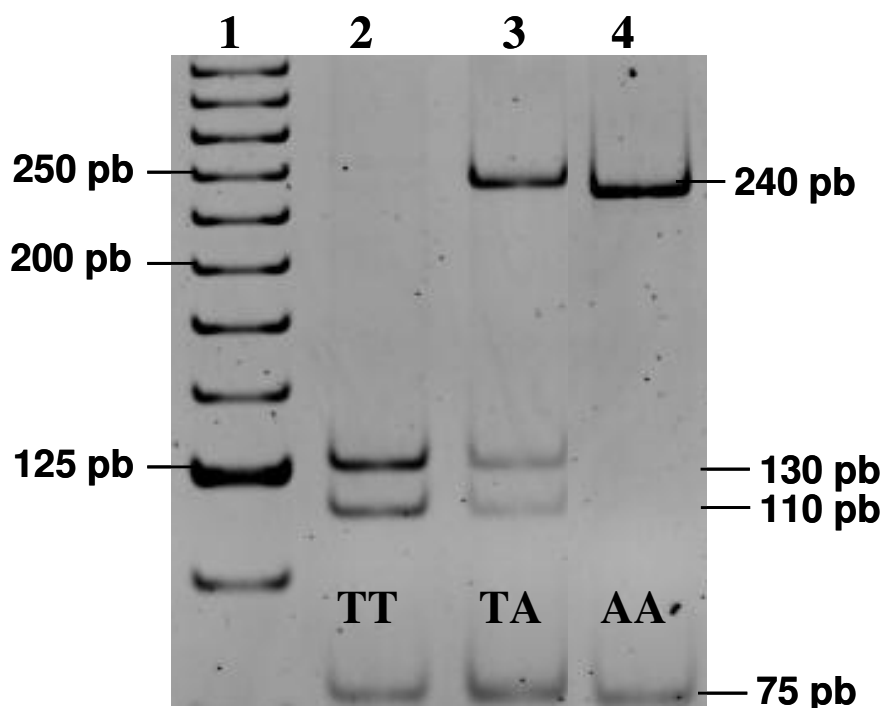


Figura 09-B. Perfil eletroforético da reação dos produtos de PCR-RFLP (344pb) da região promotora do gene RAGE submetidos à clivagem com a enzima *Tsp 509 I*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm). A linha 1 mostra o marcador de 25 pb. As linhas 2, 3 e 4 mostram respectivamente os perfis de restrição para os genótipos -374TT, -374TA e -374AA. À direita do gel está indicado o tamanho molecular dos fragmentos obtidos.

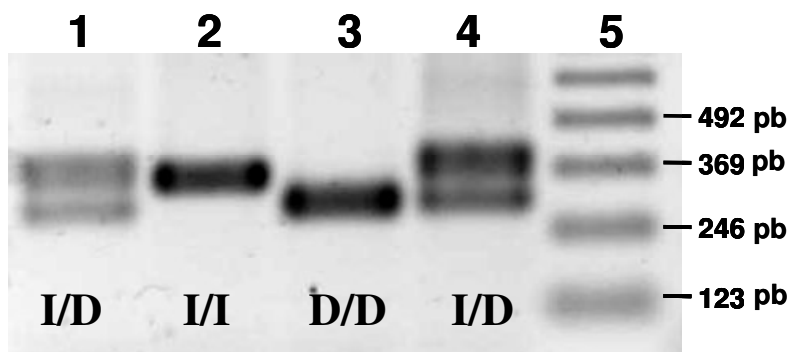


Figura 10-A. Perfil eletroforético da deleção de 63 pb (63Del) da região promotora de RAGE em agarose 2%. As linhas 1 e 4 mostram a deleção na forma heterozigota (I/D). A linha 2 ausência de deleção (I/I) e a deleção na forma homozigota (D/D) na linha 3. Na linha 5 o marcador de tamanho molecular de 123 pb (Invitrogen).

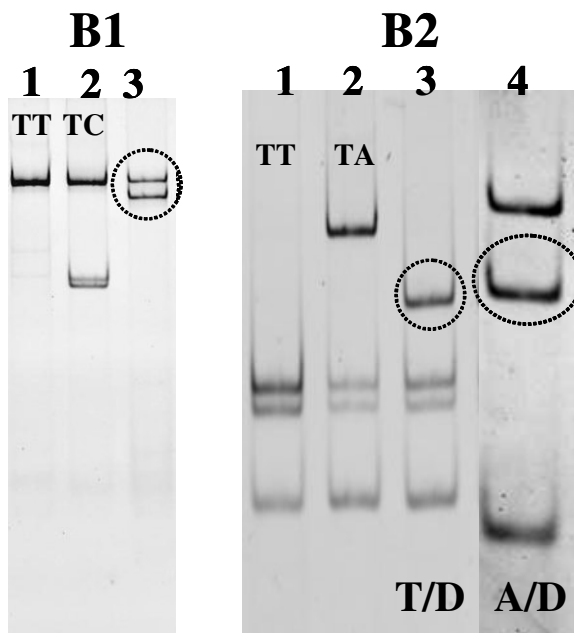


Figura 10-B. Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP da região promotora do gene RAGE submetidos à clivagem com *Alu* I (gel B1) e *Tsp* 509 I (gel B2). Os fragmentos de restrição foram separados como descrito para os polimorfismos -429T>C e -374T>A e possibilitam identificar a deleção de 63 bp na região promotora de RAGE, destacada por círculo. T/D: alelo T + deleção e A/D: alelo A + deleção.

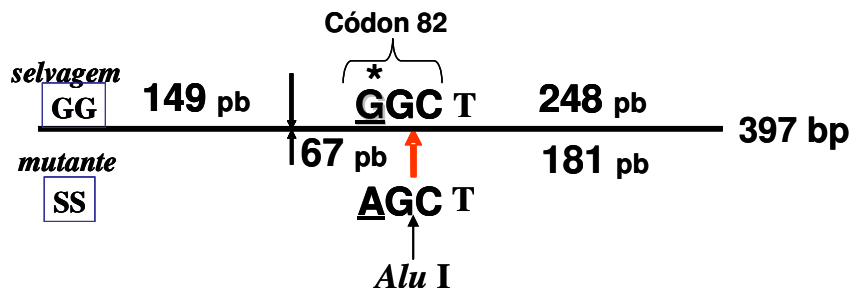


Figura 11-A. Mapa de restrição da região do exon 3 do gene RAGE com a enzima *Alu I* (AG↓CT). No mutante uma substituição do nucleotídeo guanina (G) por adenina (A) no códon 82 cria sítio de restrição que permite diferenciar os genótipos. As setas indicam os sítios de clivagem.

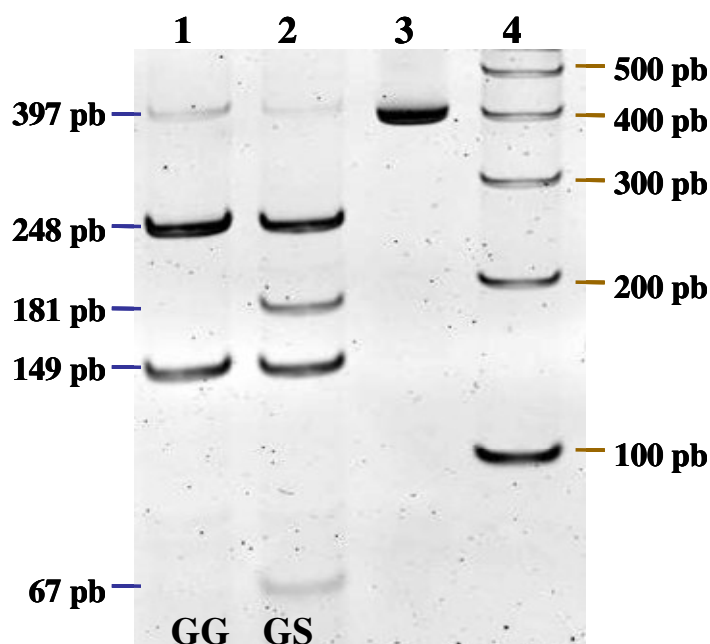


Figura 11-B. Perfil eletroforético da reação de PCR-RFLP (397 pb) para a região do exon 3 do gene RAGE clivado com a enzima *Alu I*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm). As linhas 1 e 2 mostram respectivamente os perfis de restrição para os genótipos GG (*G82G*) e GS (*G82S*). Na linha 3 o produto de PCR sem corte, e na linha 4 o marcador de tamanho molecular de 100 pb. À esquerda do gel o tamanho molecular dos fragmentos obtidos.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se nas Tabelas 14 a 17.

Tabela 14. Comparações entre as frequências genotípica e alélica para o polimorfismo -429T>C nas amostras em estudo.

Polimorfismos/Genótipos		CTRL n=81	DM2+DAC+ n=91	DAC+ n=148	Amostra total n=320
<b>-429</b>	<b>T/T</b>	64 (79,0)	78 (85,7)	119 (80,4)	261 (81,6)
	<b>T/C</b>	17 (21,0)	12 (13,2)	29 (19,6)	58 (18,1)
	<b>C/C</b>	0 (0)	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,3)
P*		0,31 <sup>a</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,38 <sup>a</sup>	---
<b>Frequência do alelo C</b>		0,10	0,08	0,08	0,09
<b>[95% IC]</b>		[0,06 – 0,15]	[0,04 – 0,12]	[0,05 – 0,11]	[0,07 – 0,12]
P <sup>alelo</sup>		0,36 <sup>a</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,39 <sup>a</sup>	---
H-W (P)		0,29	0,50	0,23	0,23

Valores dos genótipos são n (%).

P: teste exato de Fisher bidirecional.

P\*: -429 TT vs TC+CC.

<sup>a</sup>: comparação entre CTRL e DM2+DAC+ ou DAC+

<sup>b</sup>: comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

H-W. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ).

IC. Intervalo de Confiança de 95%.

P<sup>alelo</sup>. Comparação entre as frequências alélicas (teste de  $\chi^2$ ).

Tabela 15. Comparações entre as frequências genotípica e alélica para o polimorfismo -374T>A nas amostras em estudo.

Polimorfismos/Genótipos		CTRL n=78	DM2+DAC+ n=87	DAC+ n=146	Amostra total n=311
	T/T	35 (44,9)	43 (49,4)	61 (41,8)	139 (44,7)
<b>-374</b>	T/A	37 (47,4)	34 (39,1)	74 (50,7)	142 (46,6)
	A/A	6 (7,7)	10 (11,5)	11 (7,5)	27 (8,7)
	P**		0,53 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a</sup>
	H-W (P)	0,38	0,19	0,08	0,31
	Frequência do aleloA	0,31	0,31	0,33	0,31
	[95% IC]	[0,24 – 0,39]	[0,24 – 0,38]	[0,27 – 0,38]	[0,28 – 0,35]
	P <sup>alelo</sup>		0,94 <sup>a</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,78 <sup>a</sup>

Valores dos genótipos são n (%).

P: teste exato de Fisher bidirecional.

P\*\*: -374 TT vs TA+AA.

<sup>a</sup>: comparação entre CTRL e DM2+DAC+ ou DAC+

<sup>b</sup>: comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

H-W. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ).

IC. Intervalo de Confiança de 95%.

P<sup>alelo</sup>. Comparação entre as frequências alélicas (teste de  $\chi^2$ ).

Tabela 16. Comparações entre as frequências genotípica e alélica para a deleção de 63 pb (63Del) nas amostras em estudo.

Polimorfismos/Genótipos		CTRL n=81	DM2+DAC+ n=91	DAC+ n=148	Amostra total n=320
<b>63Del<sup>†</sup></b>	<b>I/I</b>	78 (96,3)	87 (95,6)	146 (98,6)	311 (97,2)
	<b>I/D</b>	3 (3,7)	3 (3,3)	2 (1,4)	7 (2,5)
	<b>D/D</b>	0 (0)	1 (1,1)	0 (0)	1 (0,3)
P***			1,00 <sup>a</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>
H-W (P)		0,86	0,0003	0,96	0,0002
Frequência de D		0,02	0,03	0,007	0,016
[95% IC]		[0,00 – 0,04]	[0,00 – 0,05]	[0,00 – 0,01]	[0,00 – 0,02]
P <sup>alelo</sup>			0,58 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,10 <sup>a</sup>

Valores dos genótipos são n (%).

P: teste exato de Fisher bidirecional.

P\*\*\*. I/I vs I/D + D/D.

<sup>a</sup>: comparação entre CTRL e DM2+DAC+ ou DAC+

<sup>b</sup>: comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

<sup>†</sup>I/D: Inserção/Deleção

H-W. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ).

IC. Intervalo de Confiança de 95%.

P<sup>alelo</sup>. Comparação entre as frequências alélicas (teste de  $\chi^2$ ).

Tabela 17. Comparações entre as frequências genotípica e alélica para o polimorfismo *G82S* nas amostras em estudo.

Polimorfismos/Genótipos		CTRL n=81	DM2+DAC+ n=91	DAC+ n=148	Toda amostra n=320
<i>G82S</i> <sup>†</sup>	G/G	78 (96,3)	83 (91,2)	142 (95,9)	303 (94,7)
	G/S	3 (3,7)	8 (8,8)	6 (4,1)	17 (5,3)
	S/S	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
P****		0,22 <sup>a</sup>		0,16 <sup>b</sup>	1,0 <sup>a</sup>
H-W (P)		0,86	0,66	0,80	0,63
Frequência do alelo S		0,02	0,04	0,02	0,027
[95% IC]		[0,00 – 0,04]	[0,01 – 0,07]	[0,00 – 0,04]	[0,01 – 0,04]
P <sup>alelo</sup>		0,18 <sup>a</sup>		0,13 <sup>b</sup>	0,90 <sup>a</sup>

Valores dos genótipos são n (%).

P: teste exato de Fisher bidirecional.

P\*\*\*\*. GG vs GS.

<sup>a</sup>: comparação entre CTRL e DM2+DAC+ ou DAC+

<sup>b</sup>: comparação entre DM2+DAC+ e DAC+

H-W. Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de  $\chi^2$ ).

IC. Intervalo de Confiança de 95%.

P<sup>alelo</sup>. Comparação entre as frequências alélicas (teste de  $\chi^2$ ).

O desequilíbrio de ligação foi analisado para os polimorfismos -429T>C e -374T>A. Os resultados encontram-se nas tabelas 18 A-C

Tabelas 18 A-C. Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -429 T> e -374 T>A. nos grupos controle (A), DM2+DAC+ (B) e DAC+ (C).

**A**

Tab 18A	Grupo CTRL		
Genótipos	-374 TT	-374 TA	-374 AA
-429 TT	26	30	6
-429TC	10	6	0
-429 CC	0	0	0
D' (P)	100% (< 0,01)		

**B**

Tab 18 B	Grupo DM2+DAC+		
Genótipos	-374 TT	-374 TA	-374 AA
-429 TT	33	31	10
-429 TC	9	3	0
-429 CC	1	0	0
D' (P)	100% (< 0,0016)		

**C**

Tab 18 C	Grupo DAC+		
Genótipos	-374 TT	-374 TA	-374 AA
-429 TT	46	62	10
-429 TC	17	12	0
-429 CC	0	0	0
D' (P)	100% (0,0001)		

O valor de D' representa o valor de desequilíbrio padronizado ( $D' = D/D_{\max}$ ). Análise realizada com o programa ARLEQUIM.



### 5.3 Análises de PCR-SSCP

A Figura 12 mostra o perfil eletroforético para o ensaio de SSCP da região promotora de RAGE

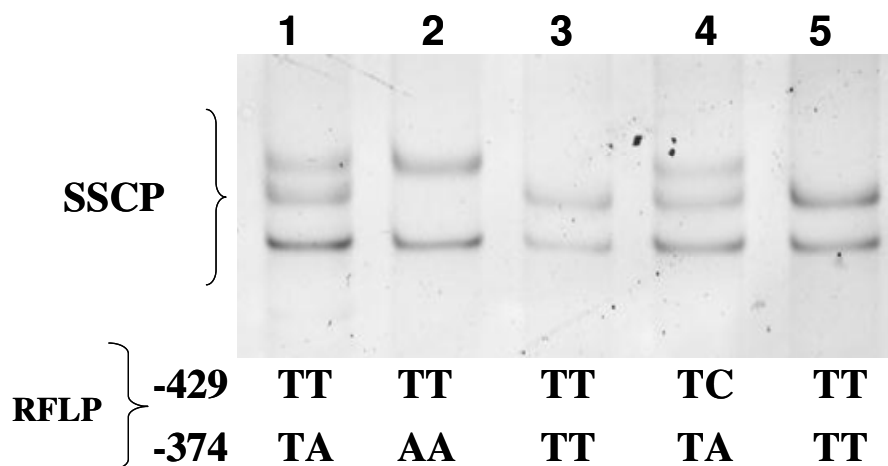


Figura 12. Perfil eletroforético de PCR-SSCP para a região promotora de RAGE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X com 10% de glicerol. A 5 µL de produto de PCR (~ 25 ng) foram acrescidos 10 µL de tampão formamida, incubados a 98°C por 10 minutos e o volume total aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a temperatura ambiente (~ 22°C) por 16 horas a 200V. Coloração com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 5 mostram os diferentes padrões de separação das fitas simples correlacionadas com os genótipos obtidos por PCR-RFLP.

As condições em que foram realizadas as corridas eletroforéticas para as reações de SSCP permitem analisar polimorfismos associados a diferentes conformações da fita de DNA e formação de heteroduplex. A Figura 13 mostra em destaque alterações de fita dupla (heteroduplex) e perfil de SSCP anômalos associados à deleção de 63 pares de base da região promotora.

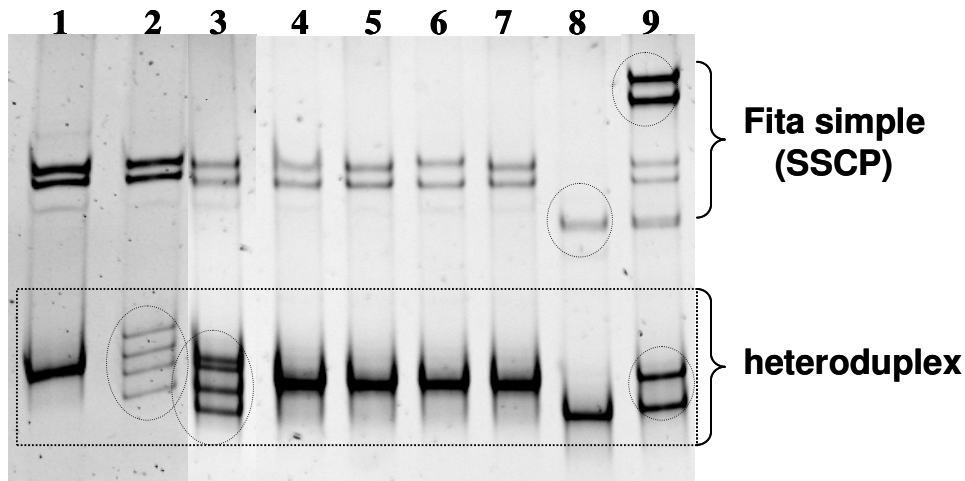


Figura 13. Perfil eletroforético (montagem de vários géis) da reação de PCR-SSCP para a região promotora de RAGE com destaque para análise de heteroduplex.

As condições de eletroforese estão descritas na figura 05.

As linhas 1, 4, 5, 6 e 7 mostram o perfil selvagem da SSCP nas condições analisadas. As linhas 2 e 3 mostram um perfil incomum de migração heteroduplex. A linha 8 mostra o perfil para amostra com deleção de 63 pb na forma homozigota e a linha 9 a deleção na forma heterozigota.

Foram detectados na amostra total quatro indivíduos (1,25%) com os perfis eletroforéticos idênticos aos apresentados na Figura 13 nas linhas 2 e 3. Dois pertencentes ao grupo CTRL, um ao grupo DM2+DAC+ e um ao grupo DAC+.

Para a região do exon 3 do gene RAGE, embora várias tentativas de otimização das condições de SSCP tenham sido testadas, apenas dois padrões diferentes foram observados. O perfil eletroforético característico da SSCP é mostrado na Figura 14.

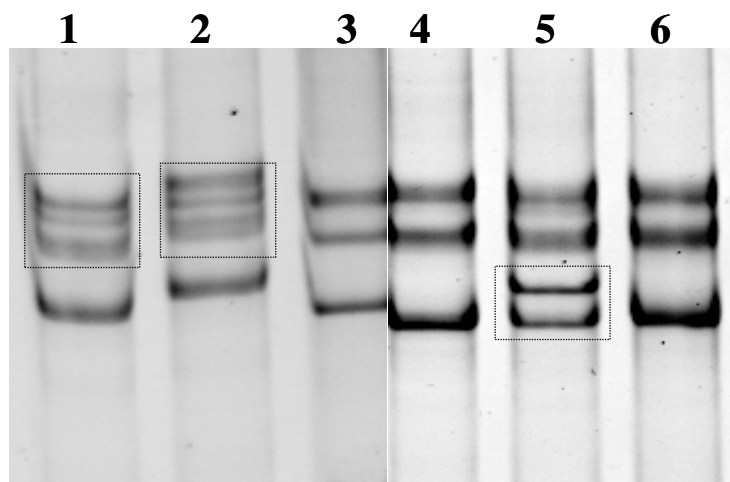


Figura 14. Perfil eletroforético (montagem de vários géis) da técnica de PCR-SSCP para a região do exon 3 de RAGE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X com 10% de glicerol. A 5  $\mu$ L de produto de PCR (~ 25 ng) foram acrescidos 10  $\mu$ L de tampão formamida, incubados a 98°C por 10 minutos e o volume total aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada na geladeira (~ 4 – 8 °C) por 16 horas a 220V. Coloração com brometo de etídeo.

Os padrões de SSCP diferentes (em destaque) encontram-se nas linhas 1 e 2 (similares) bem como na linha 5. As amostras nas linhas 3, 4 e 6 representam o padrão de SSCP selvagem.

Para a região do exon 3 de RAGE não foi observado em nenhuma amostra alteração do padrão de fita dupla (heteroduplex). Na amostra foram encontrados dois pacientes com o perfil mostrado na Figura 14 linhas 1 e 2 (0,61%) pertencentes ao grupo DAC+ e três pacientes com o perfil mostrado na linha 5 da mesma figura (0,94%) pertencentes ao grupo CRTL (1) e dois ao grupo DM2+DAC+.

#### 5.4 Análise de Sequenciamento de DNA

Amostras com perfil genotípico conhecido e outras aleatoriamente escolhidas foram sequenciadas para confirmar os achados obtidos na reação de PCR-RFLP.

Para o exon 3, todas as amostras contendo a mutação G82S foram sequenciadas em ambos os sentidos (n=17), bem como 40 amostras do genótipo G82G. A Figura 15 mostra o eletroforetograma da reação de sequenciamento, caracterizando a mutação G82S em heterozigose. Não foi observada qualquer discrepância entre o sequenciamento e a reação de PCR-RFLP para o polimorfismo G82S.

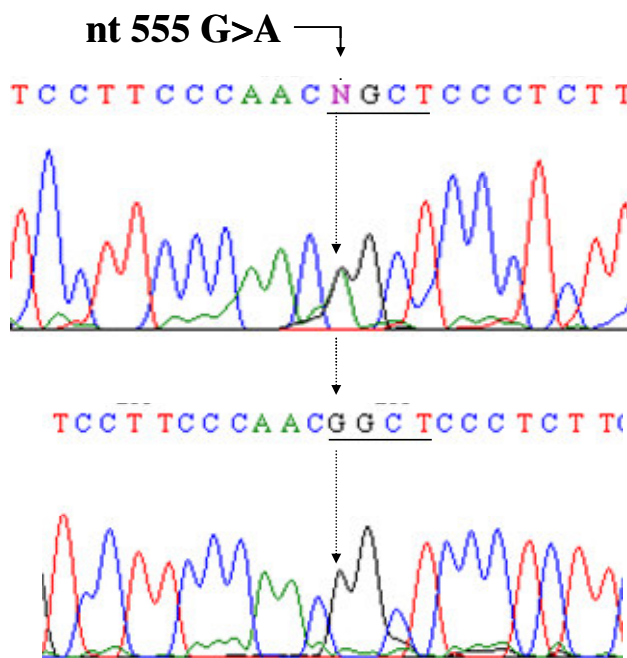


Figura 15. Eletroforetograma da reação de sequenciamento da região do exon 3 de RAGE evidenciando o sítio de substituição G→A na posição 555.

O eletroforetograma na parte superior mostra a substituição G→A em heterozigose (G82S) e na parte inferior o genótipo usual GG (G82G). A substituição G→A está localizada no códon 82 sendo que a sequência GGC codifica para o aminoácido glicina (Gly ou G) e o AGC codifica para serina (Ser, S). A barra horizontal identifica o sítio de restrição para a enzima *AluI*.

Cerca de cinquenta amostras foram seqüenciadas em ambos os sentidos para a região promotora do gene RAGE. Não foram observados para os polimorfismos -429 T>C e -374 T>A nenhuma discrepância entre o seqüenciamento e a reação de PCR-RFLP. A Figura 16 exemplifica os achados de seqüenciamento.

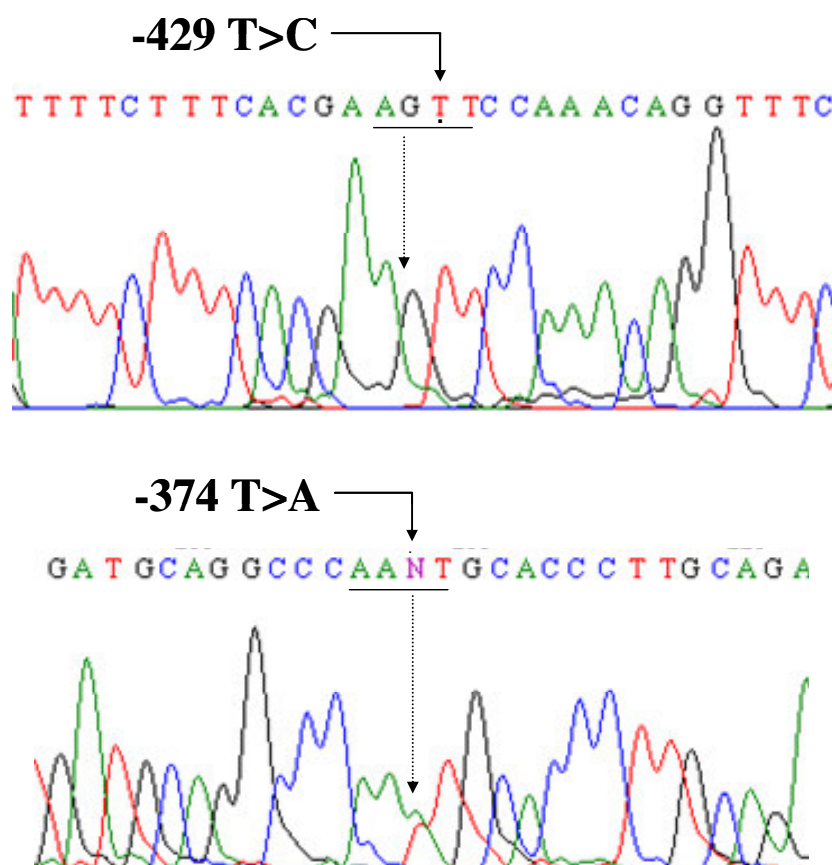


Figura 16 Eletroforetograma da reação de seqüenciamento da região promotora de RAGE de uma mesma amostra, evidenciando os sítios de substituição -429 T>A e -374 T>A.

O eletroforetograma superior mostra o polimorfismo -429 T>A em homozigose (-429 TT) e na parte inferior o genótipo hetetozigoto -374TA. A barra horizontal identifica o sítio de restrição para as enzimas *AluI* (-429) e *Tsp* 509 I (-374).

A amostra apresentando a deleção de 63 pb em homozigose foi sequenciada e o resultado do alinhamento (BioEdit) que confirma a deleção é mostrado na Figura 17.

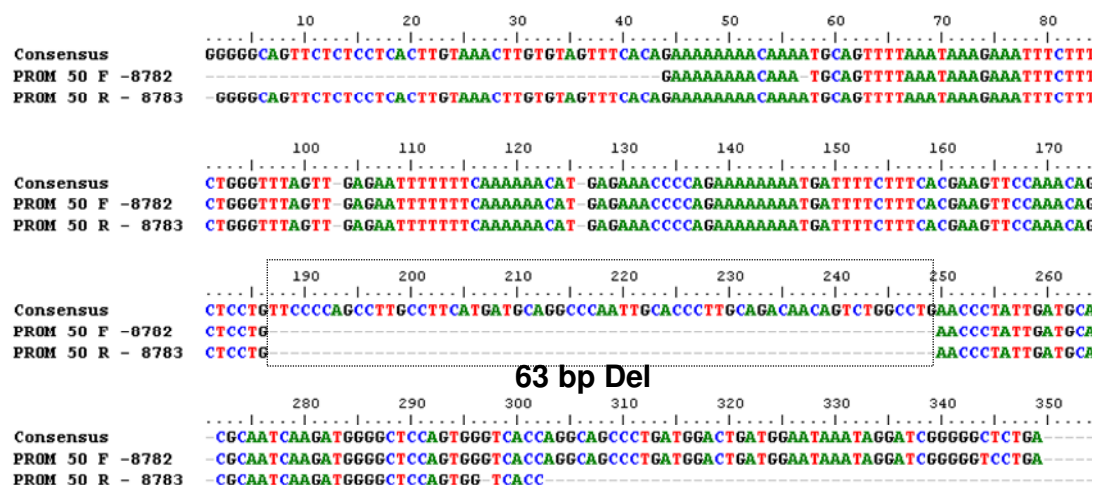


Figura 17. Alinhamento do sequenciamento da região promotora evidenciando a deleção de 63pb em homozigose.

O alinhamento foi realizado com o programa BioEdit e foi utilizada como comparativo (*consensus*) a sequência depositada no GenBank (D67259).

### 5.5 Análises de Correlação

Os polimorfismos do gene RAGE em estudo foram correlacionados com todas as variáveis através da análise de correlação linear. Os valores significativos ( $P < 0,05$ ) para a correlação (Pearson) estão mostrados na Tabela 19. A deleção de 63 pb (63 Del) não apresentou nenhum resultado significativo.

Tabela 19. Resultados significativos ( $P < 0,05$ ) para análise de correlação linear (coeficiente de Pearson) entre os polimorfismos e parâmetros em estudo.

Grupos/ polimorfismos	-429T>C	-374T>A	G82S
<b>CTRL</b>	----	----	História para DAC: -0,285 ( $P=0,023$ )
<b>DM2+CAD+</b>	Log(TG/HDL-C): -0,225 ( $P=0,036$ )	HDL-C: 0,24 ( $P=0,026$ )	Colesterol: 0,285 ( $P=0,007$ ) LDL-C: 0,215 ( $P=0,045$ ) TG: 0,276 ( $P=0,010$ ) apoB: 0,228 ( $P=0,033$ ) F-AGEs: 0,331 ( $P=0,002$ )
<b>DAC+</b>	-----	Log(TG/HDL-C): -0,168 ( $P=0,042$ ) TG: -0,170 ( $P=0,039$ )	----

Para análise de correlação foram utilizados os códigos: -429 (TT=1; TC=2; CC=3); -374 (TT=1; TA=2; AA=3) e G82S (GG=1; GS=2).

A relação dos polimorfismos em estudo sobre os parâmetros bioquímicos foi avaliada comparando a média e desvio padrão para a amostra, separada por genótipos. Foram comparados os genótipos -429 TT versus -429 TC + CC; -374 TT versus -374 TA + AA e G82G versus G82S. O valor de probabilidade (P) para os analitos representativos é mostrado na Tabela 20.

Tabela 20. Polimorfismos -429T>C, -374T>A e G82S do gene RAGE e valores de probabilidade (P) da análise de variância (ANOVA) de parâmetros laboratoriais nos grupos em estudo.

Analitos/Polimorfismos	DM2+DAC+			DAC+		
	-429T>C	-374T>A	G82S	-429T>C	-374T>A	G82S
Glucose	0,75	0,95	0,21	0,99	0,45	0,67
HbA <sub>1C</sub>	0,82	0,96	0,45	0,41	0,40	0,59
Colesterol total	0,40	0,42	<b><u>0,009</u></b>	0,75	0,06	0,18
HDL-C	0,49	<b><u>0,04</u></b>	0,48	0,93	0,21	0,25
LDL-C	0,73	0,99	<b><u>0,046</u></b>	0,72	0,21	0,57
Triglicérides†	<b><u>0,03</u></b>	0,08	<b><u>0,013</u></b>	0,72	<b><u>0,003</u></b>	0,92
[Log(TG/HDL-C)]	0,11	0,30	0,08	0,72	<b><u>0,003</u></b>	0,56
F-AGE/g Proteína ‡	0,45	0,56	<b><u>0,002</u></b>	0,96	0,78	0,82

Teste “t” *One way* ANOVA

† calculado com transformação logarítmica

‡ teste U de Mann-Whitney

Comparações -429 TT vs TC+CC; -374 TT vs TA+AA. e G82G vs G82S

As médias comparadas são aquelas descritas nas tabelas 11 e 12.

Os valores de média e desvio padrão para os analitos que apresentaram diferença significativa na Tabela 20 são mostrados na Tabela 21.



Tabela 21. Valores de média e desvio padrão para os analitos que apresentaram diferença significativa em qualquer dos polimorfismos em estudo

grupos	DM2+DAC+						DAC+	
Analitos/Polimorfismos	<b>-429T&gt;C</b>		<b>-374T&gt;A</b>		<b>G82S</b>		<b>-374T&gt;A</b>	
	<b>TT vs TC+CC</b>		<b>TT vs TA+AA</b>		<b>GG vs GS</b>		<b>TT vs TA+AA</b>	
Colesterol total (mg/dL)	172,3±40,5	162,0±42,6	174,5±43,2	150,9±36,4	167,4±40,0	206,5±32,1	171,3±35,0	159,7±38,2
P	0,40		0,42		<b><u>0,009</u></b>		0,061	
HDL-C (mg/dL))	39,5±10,4	37,4±8,2	37,2±9,0	41,7±10,8	38,9±10,1	41,6±10,3	40,1±10,0	42,3±10,3
P	0,49		<b><u>0,039</u></b>		0,48		0,21	
LDL-C (mg/dL)	111,6±29,6	108,0±37,7	111,3±31,5	111,2±29,2	109,1±30,9	131,7±19,6	114,0±31,9	106,7±36,6
P	0,35		1,00		<b><u>0,046</u></b>		0,21	
Triglicérides <sup>†</sup> (mg/dL)	170,7±105,4	114,4±47,7	172,4±110,8	150,9±92,6	154,3±93,1	249,6±148,8	143,3±69,2	114,4±69,9
P	<b><u>0,03</u></b>		0,30		<b><u>0,013</u></b>		<b><u>0,003</u></b>	
Log(TG/HDL-C)	0,59±0,28	0,46±0,18	0,61±0,27	0,51±9,27	0,55±0,26	0,70±0,29	0,52±0,24	0,39±0,26
P	0,11		0,08		0,058		<b><u>0,003</u></b>	
F-AGE/g Proteína <sup>‡</sup>	64,7±18,0	62,4±16,1	63,1±16,1	65,3±19,5	63,2±16,5	76,8±24,9	63,2±20,9	64,1±17,8
P	0,45		0,56		<b><u>0,002</u></b>		0,76	

Os dados são média ± desvio padrão

Teste “t” amostras não pareadas; † calculado com transformação logarítmica; ‡ teste U de Mann-Whitney

### 5.6 Associação entre a concentração da Hemoglobina Glicada (HbA<sub>1C</sub>) e polimorfismos de RAGE em diabéticos tipo 2.

A relação entre a Hemoglobina glicada e os polimorfismos do gene RAGE em estudo para o grupo diabético (DM2+DAC+) está mostrado na Tabela 22.

Tabela 22. Distribuição dos valores de hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>) em relação aos polimorfismos de RAGE no grupo com diabetes tipo 2 (DM2+DAC+).

Polimorfismos	<b>-429T&gt;C</b>		<b>-374T&gt;A</b>			<b>G82S</b>	
<b>HbA<sub>1C</sub> (%)</b>	<b>TT</b>	<b>TC+CC</b>	<b>TT</b>	<b>TA</b>	<b>AA</b>	<b>GG</b>	<b>GS</b>
≤7,0%	36 (83,7)	7 (16,3)	20 (48,8)	16 (39,0)	5 (12,2)	38 (88,4)	5 (11,6)
>7,0-< 8,0	19 (95,0)	1 (5,0)	11 (57,9)	6 (31,6)	2 (10,5)	20 (100)	0 (0)
≥ 8,0	23 (82,1)	5 (17,9)	12 (44,4)	12 (44,4)	3 (11,2)	25 (89,3)	3 (10,7)
<b>P*</b>	0,49		0,94			0,28	

\*Teste exato de Fisher bidirecional (RxC)

### 5.7 Polimorfismo -374T>A e severidade da DAC

A Tabela 23 mostra a associação entre a distribuição genotípica para o polimorfismo -374 T>A e indicadores da severidade da DAC para os grupos DM2+DAC+ e DAC+. As comparações foram realizadas entre o genótipo AA comparado aos genótipos TT+TA. Quando as comparações foram realizadas comparando os genótipos TT e TA+AA não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 23. Distribuição genotípica e indicadores de severidade da DAC associados ao polimorfismo -374T>A na população em estudo.

	DM2+DAC+ N=87			DAC+ n=146		
Genótipos	AA	TT+TA	P	AA	TT+TA	P
n (M/F)	10 (4/6)	77 (46/31)	0,31 <sup>†</sup>	11 (8/3)	135 (99/37)	1,0 <sup>†</sup>
Número total de vasos lesados (M±DP)	1,20±0,8	2,15±1,31	<b>0,01</b>	2,18±1,0	2,24±1,0	0,86*
Índice de Duke (M±DP)	29,7±10,4	48,5±19,9	<b>0,01*</b>	47,8±16,3	46,2±19,1	0,79*
Vasos lesados, n (%)						
Um	4 (4,6)	17 (19,5)		3 (2,1)	39 (26,7)	
Dois	6 (6,9)	27 (31,1)		4 (2,8)	39 (26,7)	
Três	0 (0)	33 (37,9)	<b>0,01<sup>‡</sup></b>	4 (2,8)	57 (38,9)	0,92 <sup>‡</sup>

M±DP: média ± desvio padrão

\* teste “t” não pareado

<sup>†</sup> teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ )

<sup>‡</sup> teste exato de Fisher bidirecional

Amostras apresentando a deleção de 63pb foram excluídas da análise

### 5.8 Análise da região promotora de RAGE em diabéticos tipo 1

As frequências genóticas e alélicas da amostra de pacientes diabéticos tipo 1 (Materiais e Métodos 4.1.2) foram comparadas com a de pacientes que não apresentam diabetes representados pela soma dos indivíduos do grupo controle com aqueles do grupo DAC+. As amostras de pacientes que apresentaram a deleção de 63 pb foram excluídas da análise. A Tabela 24 mostra a referida comparação para os polimorfismos -429T>C e -374T>A.

Tabela 24. Comparações entre as frequências genóticas e alélicas de indivíduos diabéticos tipo 1 (DM1) e não-diabéticos (NDM).

Polimorfismos		NDM n=225	DM1 n=102	P
<b>-429</b>	<b>T/T</b>	181 (80,4)	66 (64,7)	
	<b>T/C</b>	44 (19,6)	34 (33,3)	
	<b>C/C</b>	0 (0)	2 (2,0)	<b>0,003*</b>
Frequência do alelo C [95% CI]		0,10 [0,07 – 0,13]	0,19 [0,13 – 0,24]	( $\chi^2$ ) <b>0,001</b>
<b>-374</b>	<b>T/T</b>	96 (42,7)	45 (44,1)	
	<b>T/A</b>	111 (49,3)	48 (47,1)	
	<b>A/A</b>	18 (8,0)	9 (8,8)	0,81**
Frequência do alelo A [95% CI]		0,33 [0,28 – 0,37]	0,32 [0,26 – 0,39]	( $\chi^2$ ) 0,91

Valores dos genótipos são n (%).

P: teste exato de Fisher bidirecional.

Frequências alélicas, valor de P do teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ )

CI: intervalo de confiança de 95%

P\*, -429 TT vs TC+CC

P\*\*, -374 TT vs TA+AA

## 6. Discussão

O *Diabetes mellitus* (DM) e a doença arterial coronariana (DAC) são patologias que afetam uma parcela muito significativa dos indivíduos na sociedade moderna. Estas patologias são semelhantes quanto à multiplicidade de fatores envolvidos no desenvolvimento da doença, bem como na severidade da mesma. São patologias que não estão associadas a um defeito em um único gene – monogênicas - e sim resultantes da combinação de múltiplos efeitos de diferentes genes e fatores ambientais. Outra relação importante entre o diabetes e a DAC está na elevada frequência com que estas patologias aparecem de forma concomitante.

Vários marcadores para o diagnóstico ou monitoramento destas patologias têm sido propostos e estudados nas últimas décadas. Entre estes, polimorfismos genéticos, em especial aqueles derivados da substituição de um único nucleotídeo (SNP) têm sido relacionados ao diabetes e a DAC. Estes estudos ganharam um novo impulso na última década com o seqüenciamento do genoma humano e a estimativa de que podem existir cerca de 10 milhões de polimorfismos no genoma e muitos funcionais (YUE e MOULT, 2006).

Neste trabalho foi analisada a relação dos produtos de glicação avançada, com ênfase no polimorfismos do gene que codifica o receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) com o *Diabetes mellitus* e doença arterial coronariana.

### 6.1 Amostra

A amostra selecionada foi caracterizada pela predominância de Euro-Brasileiros (95,1%) em decorrência das características da população que procurou os serviços de hemodinâmica do Hospital C. Costantini, o principal colaborador na coleta das amostras. Os grupos estudados não diferem significativamente ( $P>0,05$ ) quanto à composição de Euro- e Afro-Brasileiros.

No início do projeto esta característica foi interessante e desejável por tornar a amostra mais homogênea e por não dispormos de informações na literatura, naquele momento, sobre diferenças genótípicas ou alélicas entre grupos étnicos brasileiros.

### **6.1.1 Características demográficas da amostra.**

#### **Sexo e idade**

A Tabela 10 resume as características demográficas da amostra. O grupo DAC+ apresentou uma maior frequência ( $P<0,01$ ) de homens quando comparado aos demais grupos. A DAC é tradicionalmente uma patologia que acomete com maior frequência indivíduos do sexo masculino (PHILLIPS *et al.*, 2004). Embora esta tendência venha se modificando nas sociedades modernas, onde o número de mulheres se aproxima ao dos homens com risco de DAC, outros estudos de populações de brasileiros refletem achados semelhantes aos descritos neste trabalho (PIEGAS *et al.*, 2003).

Os indivíduos que compõem os grupos DM2+DAC+ e DAC+ não diferem significativamente ( $P=0,33$ ) quanto à idade e são cerca de cinco anos mais velhos que os participantes do grupo controle (DM2–DAC–). Esta característica também é esperada entre os grupos, uma vez que o diabetes e a DAC são doenças onde o aparecimento tardio prepondera (SHARMA *et al.*, 2003).

#### **Índice de massa corporal**

O índice de massa corporal (IMC) foi significativamente diferente entre os três grupos em estudo ( $P<0,001$ ). Este índice aumentou progressivamente no sentido do grupo controle, grupo com DAC+ e grupo com diabetes. Estes resultados concordam com o de outros trabalhos que mostram uma associação de DAC com o aumento ponderal (LAZAR, 2005) e da obesidade com o diabetes tipo 2 (AUER *et al.*, 2005; YOLOGLU *et al.*, 2005).

### **Pressão arterial**

As médias das pressões sistólica e diastólica não diferiram entre os grupos ( $P>0,05$ ). Quando estes dados são associados à presença de hipertensão arterial, que supera os 40% em todos os grupos, é possível concluir que estes pacientes encontram-se sob intensa terapia anti-hipertensiva, o que mascara as possíveis diferenças na medida da pressão. Deve-se ressaltar que cerca de 60% dos indivíduos que compõem o grupo controle apresentaram hipertensão arterial, sendo possivelmente este um dos principais fatores de risco levaram à decisão de submeter estes pacientes ao procedimento angiográfico.

### **Dislipidemia e infarto agudo do miocárdio**

As frequências de dislipidemia, caracterizada pelas elevações nas concentrações séricas de colesterol e/ou triglicérides, e a história familiar para a doença arterial coronariana não diferiram entre os grupos ( $P\geq 0,13$ ;  $\geq 0,47$ , respectivamente). As frequências observadas são similares às descritas em estudos que abordam indivíduos na mesma faixa etária aos deste trabalho (TAN *et al.*, 2001; PIEGAS *et al* 2003). A alta frequência de indivíduos que sofreram infarto agudo do miocárdio nos grupos DM2+DAC+ (20%) e DAC+ (26%) mostra a associação deste evento com os fatores de risco apresentados pelos indivíduos que compõem a amostra.

### **Tabagismo**

O grupo controle apresenta um elevado percentual de tabagistas (cerca de 60%). A redução significativa ( $P=0,03$ ) no uso do tabaco no grupo DAC+ quando comparado ao grupo controle, sugere o efeito esperado da mudança no estilo de vida em muitos indivíduos, após a detecção de complicações decorrentes da DAC. Deve-se avaliar, no entanto, que apesar dos inúmeros trabalhos associando o fumo à doença cardiovascular e das intensas campanhas anti-tabagistas na mídia local e global, este hábito é disseminado e exerce um efeito marcante na população brasileira, como evidenciado nestes dados (AMBROSE *et al* 2004). O grupo DM2+DAC+, embora não difira

significativamente do grupo controle, sugere uma migração no número de tabagistas para ex-tabagistas, como no grupo DAC+.

Tomada em conjunto, a amostra foi subclassificada em grupos com a distribuição de etnia similar, representando essencialmente a população Euro-Brasileira, e com as características demográficas e clínicas esperadas para as patologias envolvidas no processo classificatório.

### **6.1.2 Parâmetros laboratoriais**

Os resultados das análises laboratoriais estão mostrados nas Tabelas 11 e 12.

#### **Perfil lipídico e indicadores laboratoriais de risco para DAC.**

As concentrações séricas de colesterol total e LDL-colesterol (LDL-C) apresentaram perfil semelhante, com diferenças significativas ( $P=0,03$ ; Tabela 11) apenas entre os grupos controle e DAC+. A menor concentração destes analitos no grupo DAC+ e a relativa insensibilidade destes parâmetros na diferenciação dos grupos pode ser atribuída à intensa e agressiva terapia antilipemiantes a que são submetidos estes pacientes. Esta análise é substantiada pelo fato de que as concentrações médias de colesterol e LDL-C são menores no grupo com DAC+ em relação ao grupo controle. As concentrações de apolipoproteína B (apoB), o componente protéico majoritário da fração LDL, não diferiu significativamente ( $P\geq 0,12$ ) entre os grupos estudados. Portanto, as concentrações séricas de LDL-C discriminaram melhor os grupos estudados do que os da apoB.

As concentrações do colesterol na fração HDL (HDL-C) no grupo controle foram significativamente maiores ( $P<0,001$ ) quando foi comparado aos grupos DM2+DAC+ e DAC+, enquanto que estes não diferiram entre si ( $P=0,12$ ). A associação inversa entre DAC+ e HDL-C é esperada, uma vez que uma redução na concentração do HDL-C, fração associada à mobilização do



colesterol não utilizado pelo tecido tem características aterogênicas (YOLOGLU *et al.*, 2005).

A concentração de apolipoproteína AI (apoAI), componente protéico principal da fração HDL, foi significativamente menor nos grupos DAC+ ( $P=0,03$ ) e DM2+DAC+ ( $P=0,05$ ) quando comparado ao do controle.

Analizadas em conjunto, as medidas de apoAI e apoB, altamente correlacionadas, respectivamente, com as concentrações séricas de HDL-C e LDL-C, foram menos discriminantes que os elementos do perfil lipídico. Portanto, para o grupo em estudo, determinações mais conservadoras como as do perfil lipídico se mostraram mais informativas em relação aos novos ensaios de apolipoproteínas AI e B (Tabela 11).

As concentrações séricas de triglicérides foram significativamente diferentes ( $P\leq 0,03$ ) entre todos os grupos estudados. Os triglicérides estão caracterizados como fatores de risco independente para DAC (TAN *et al.*, 2001) e, portanto, concentrações maiores nos grupos DAC+ eram esperadas. A maior concentração de triglicérides associada ao grupo com diabetes, em particular com o diabetes tipo 2, reflete as alterações deste parâmetro associadas ao controle glicêmico (Tabela 11). Um controle glicêmico inadequado, com menor disponibilidade de insulina, favorece a mobilização das reservas lipídicas na forma de triglicérides. A associação entre a hipertrigliceridemia, DAC e o diabetes tipo 2 está bem caracterizada (TAN *et al.*, 2001) e foi confirmada pelos achados deste trabalho.

Os índices para caracterizar risco de DAC tradicionais como as razões colesterol/HDL-C e LDL-C/HDL-C, respectivamente conhecidos como índices de Castelli I e II, bem como a razão apoAI/apoB, foram eficientes na discriminação dos grupos estudados. Apenas a razão colesterol/HDL-C foi significativamente maior ( $P=0,03$ ) no grupo DAC+ em relação ao controle. Este achado evidencia que os índices de risco tradicionais oferecem pouca informação diagnóstica em pacientes que fazem uso de intensa terapia hipolipemiante.

DOBIASOVÁ e FROHLICH (2001) propuseram um novo índice para caracterizar risco para DAC, combinando os efeitos das concentrações séricas de

triglicérides e do HDL-C. Este índice é dado pelo logaritmo da razão triglicérides/HDL-C ( $\log[\text{TG}/\text{HDL-C}]$ ) e foi designado como índice aterogênico do plasma (IAP). Valores do IAP superiores a 0,1 estão associados ao aumento das partículas de LDL pequenas e densas ( $\leq 25,5$  nm), de maior aterogenicidade FROHLICH e DOBIASOVÁ (2003). Entre os parâmetros laboratoriais estudados o IAP foi o que melhor discriminou ( $P \leq 0,005$ ) os grupos. Em todos os grupos, as concentrações médias são superiores a 0,30 para o IAP, portanto sugerindo a presença de partículas de LDL pequenas e densas em elevadas concentrações na maioria dos indivíduos presentes na amostra. As evidências deste trabalho apóiam a recomendação do uso da relação  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$  como marcador para estratificar risco para DAC. Este parâmetro poderá ser introduzido na composição dos resultados associados ao perfil lipídico, como um parâmetro útil e sem custos adicionais.

### **Glicemia e hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>)**

As concentrações de glicose e hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>) nos grupos reflete os critérios de classificação da amostra com os grupos controle e DAC+ não diferindo entre si ( $P > 0,09$ ; Tabela 12) e dentro de valores esperados para uma população que não apresenta *Diabetes mellitus*. As concentrações de glicose séricas e HbA<sub>1C</sub> (marcador do controle glicêmico de longo prazo), no grupo diabético são elevadas sugerindo que neste grupo predominam pacientes com pouca aderência ao controle do diabetes. O valor médio de HbA<sub>1C</sub> de 7,6% observado neste grupo, maior que a concentração preconizada como adequada para o controle glicêmico (7,0%) preconizada pela American Diabetes Association (2007) está próximo do limite máximo aceitável para o controle glicêmico (8,0%), sugerindo que uma fração importante dos indivíduos deste grupo necessita de novos planos terapêuticos para o ajuste dos níveis glicêmicos. As concentrações médias da glicemia e hemoglobina glicada no grupo DAC+ , semelhantes ao grupo controle, sugerem que neste grupo o número de indivíduos com intolerância à glicose (glicemia de jejum alterada) não detectados seja pequeno.

### **Creatinina**

As concentrações médias de creatinina, embora significativamente menores ( $P=0,01$ ) no grupo controle quando comparado aos demais, apontam para uma função renal adequada. Pacientes com concentrações de creatinina próxima de 2,5 mg/dL estão distribuídos de forma homogênea entre os grupos e, no momento da coleta, não foram caracterizados como apresentando insuficiência renal manifesta.

### **Ácido úrico**

As concentrações médias de ácido úrico foram significativamente maiores ( $P\leq 0,01$ ) nos grupos DM2+DAC+ e DAC+ quando comparadas às do grupo controle. HAYDEN e TYAGE (2004) ressaltam a associação da elevação na concentração do ácido úrico com a doença cardiovascular, doença renal e a hipertensão. Também YOO *et al* (2005) mostraram a associação independente do ácido úrico com a hipertensão arterial, resistência à insulina e fatores de risco para a síndrome metabólica. Nossos resultados apontam na mesma direção. É pertinente ressaltar que as drogas hipouricemiantes, extensivamente utilizadas por todos os indivíduos presentes na amostra, podem estar minimizando as diferenças nas concentrações de ácido úrico entre os grupos deste estudo. Assim, em novos estudos da associação da uricemia com a DAC e diabetes, deveria ser levado em conta o uso de drogas hipouricemiantes como co-variável.

### **Proteínas totais e albumina**

As concentrações séricas de proteínas totais e albumina refletem o aporte nutricional e são indicadores de alterações na função renal e hepática.

As concentrações séricas de proteínas totais e albumina não diferiram ( $P\geq 0,17$ ; Tabela 12) entre os grupos o que sugere que a condição nutricional, funções hepáticas e renais dos indivíduos em estudo são satisfatórias.

### 6.1.3 Concentrações séricas de AGEs

A concentração dos produtos de glicação avançada (AGEs) medidos por fluorescência foi significativamente maior ( $P \leq 0,001$ ) nos grupos DM2+DAC+ e DAC+ em relação ao grupo controle (Tabela 12). Este resultado pode ser explicado que o diabetes tipo 2 está associado à elevação dos AGEs (HAMMES 2003). Por outro lado, o desenvolvimento da DAC está relacionado a uma combinação de processos inflamatórios e estresse oxidativo produzem a elevação dos AGEs séricos (KILHOVD et al 1999; KIUCHI et al 2006). No entanto era esperado que o grupo com diabéticos apresentasse concentrações de AGEs superiores ao grupo DAC+, o que não foi observado ( $P=0,28$ ). KILHOVD et al (1999) observaram que a concentração sérica de AGEs em indivíduos diabéticos tipo 2 com doença cardiovascular (DCV) foi maior quando comparada àqueles sem DCV, utilizando metodologia de ELISA ( $P=0,03$ ), mas a concentração de carboximetil lisina (CML), quantificadas por HPLC, não diferiu entre os grupos. Portanto, é plausível que as características da metodologia empregada possam explicar as concentrações de AGEs observados neste trabalho, nos grupos DM2+DAC+ e DAC+. Outro elemento a ser considerado é o tratamento medicamentoso a que estão submetidos os indivíduos dos grupos anteriormente citados. Agentes hipolipemiantes, como as estatinas, apresentam entre seus efeitos pleiotrópicos as alterações nas concentrações e no mecanismo de ação do PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor*) cuja ação é inibir a hiperplasia neointimal. Recentemente foi demonstrado que o PPAR $\gamma$  promove inibição da expressão de RAGE (WANG et al, 2006), sugerindo que medicamentos interfiram com o metabolismo dos AGEs.

### 6.1.4 Características angiográficas da amostra

O número de indivíduos submetidos à intervenção, definida como a realização dos procedimentos de *bypass*, colocação de *stent* ou ambos, não diferiram nos grupos DM2+DAC+ e DAC+ ( $P=0,28$ ) (Tabela 13). Os demais

indicadores utilizados para avaliar a severidade da DAC, através de procedimento angiográfico, como o índice de severidade de Duke, o número de vasos lesados ou mesmo a distribuição de vasos lesados entre os grupos DM2+DAC+ e DAC+ não diferiram significativamente ( $P \geq 0,16$ ) nas amostras em estudo. Analisados em conjunto estes resultados sugerem que a severidade da DAC esta distribuída uniformemente entre os indivíduos dos grupos DM2+DAC+ e DAC+.

## 6.2 Análises dos polimorfismos detectados por PCR-RFLP

Quatro polimorfismos (-429T>C, -374T>A, 63Del e G82S) foram detectados nos três grupos estudados. A otimização dos procedimentos permitiu a obtenção de produtos de PCR em boa quantidade e sem bandas inespecíficas. As figuras 08, 09 e 11 mostram os perfis de restrição, respectivamente para os polimorfismos -429T>C, -374T>A e G82S. Para estes, embora os procedimentos descritos na literatura preconizem a separação eletroforética dos fragmentos de restrição em gel de agarose, neste trabalho foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida. Embora o procedimento escolhido seja mais trabalhoso e demorado, é possível observar pelas figuras apresentadas que o padrão de restrição e, conseqüentemente, a genotipagem são inequívocos. Também, a maior sensibilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida a aplicação de menores concentrações de fragmentos de DNA e conseqüente no uso redução da enzima de restrição, com diminuição nos custos do procedimento. HUDSON et al (2001), os precursores na detecção destes polimorfismos, preconizam a utilização de gel de agarose a 2% e a detecção na mesma reação para os polimorfismos -429T>C e -374T>A. Embora tenha a vantagem da otimização do tempo de ensaio, a experiência aponta que o procedimento descrito pode apresentar padrões de difícil interpretação, o que não acontece com o procedimento empregado neste trabalho. O seqüenciamento dos amplicons da região promotora

e do exon 3 de RAGE confirmaram os polimorfismos detectados por PCR-RFLP (Figuras 15 e 16).

A deleção de 63 pb na região promotora de RAGE foi detectada em gel de agarose a 2% que mostrou resolução adequada para a identificação desta mutação (Figura 10-A). Ademais, como esta mutação está localizada próxima aos sítios de restrição, que caracterizam os demais polimorfismos da região promotora, o padrão de restrição destes polimorfismos é afetado pela deleção de 63 pb (Figura 10-B). Esta característica permitiu uma dupla verificação na identificação dos indivíduos com este alelo. Não foram observadas discrepâncias entre os procedimentos de detecção da 63Del por eletroforese em agarose ou pelo padrão observado após restrição em gel de poliacrilamida, na detecção dos demais polimorfismos da região promotora de RAGE. A única amostra com deleção em homozigose foi seqüenciada e o alinhamento confirma a deleção de 63 pares de base (Figura 17).

### **6.2.1 Análise das Frequências alélicas e genotípicas**

As Tabelas 14 a 17 resumizam os resultados obtidos para os grupos em estudo. As diferenças nas frequências genotípicas foram analisadas pelo teste exato de Fisher (bidirecional) devido à baixa frequência de alguns genótipos e por ser mais conservador na detecção das diferenças quando comparado ao teste do Chi-quadrado.

As comparações dos resultados de frequência dos polimorfismos - 429T>C, -374T>A e G82S com a literatura encontram-se, respectivamente, nas Tabelas 25, 26 e 27, que mostram as frequências do alelo menor dos grupos estudados neste trabalho, comparados (Chi-quadrado) com os resultados publicados para diferentes populações e características clínicas.

### 6.2.1.1 Polimorfismo -429T>C da região promotora de RAGE

Nossos resultados (Tabela 14) não mostraram diferenças significativas ( $P \geq 0,23$ ) na distribuição genotípica ou alélica ( $P \geq 0,36$ ) entre os grupos estudados. Portanto, neste estudo não foi observada associação entre o polimorfismo -429T>C da região promotora de RAGE com a DAC na presença ou ausência do *Diabetes mellitus* tipo 2. Em todos os grupos a frequência genotípica está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A Tabela 03, na revisão bibliográfica, mostra as frequências fenotípicas e alélicas observadas em diversas populações para o polimorfismo -429T>C.

TORRES (2007), estudando populações saudáveis classificadas fenotipicamente em Euro- e Afro-Brasileiros, reportou que as frequências para o alelo C (12,9 e 12,1%, respectivamente) do polimorfismo -429T>C não diferem entre estas etnias ( $P=0,85$ ). As comparações das frequências alélicas observadas no presente trabalho com as da literatura são mostradas na Tabela 25.

As frequências do alelo raro (C) observadas nos três grupos em estudo para o polimorfismo -429T>C não foram diferentes daquelas descritas para Euro- e Afro-Brasileiros por SANTOS et al (2005), exceto para o grupo DM2+ que apresentava associação com a doença cardíaca isquêmica (DM2+DCI+) onde a frequência do alelo C (17%) foi significativamente superior ( $P=0,039$ ) à do grupo DAC+ (8%).

Tabela 25. Comparações entre as frequências do alelo C do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE nos grupos estudados e reportados na literatura.

Grupo étnico	literatura	características	n	Alelo (%)	Frequência do alelo (%)		
					P*		
				C	CTRL (10) §	DM2+DAC+ (8) §	DAC+ (8) §
<b>Brasileiros</b> TORRES, et al 2007. Dados não publicados		Euro-Brasileiros saudáveis	62	12,9	0,57	0,29	0,28
		Afro-Brasileiros saudáveis	65	12,1	0,64	0,33	0,33
<b>Brasileiros</b> PICHETH et al 2007.		DM1+	102	19	0,097	<b>0,026</b>	<b>0,022</b>
<b>Euro-Brasileiros</b> <b>Afro-Brasileiros</b> SANTOS et al, 2005		DM2+	520	12	0,59	0,24	0,19
		DM2+	183	12	0,61	0,27	0,24
		DM2+DCI+	75	17	0,17	0,058	<b>0,039</b>
		DM2+DCI-	56	10	0,87	0,53	0,56
<b>Tchecos</b> KANKOVÁ et al, 2005		DM2-	227	17,2	0,12	<b>0,029</b>	<b>0,012</b>
		DM2+ ND+	198	22	<b>0,020</b>	<b>0,0034</b>	<b>0,0006</b>
		DM2+ ND-	179	15,1	0,25	0,084	0,053
<b>Eslovenos</b> KIRBIS et al, 2004.		DM2- DAC-	241	14,7	0,29	0,095	0,059
		DM2+ DAC+	168	18,5	0,081	<b>0,019</b>	<b>0,0075</b>
<b>Eslovenos</b> GLOBOCNICK et al, 2003		DM2- RD+	116	13,8	0,41	0,16	0,14
		DM2+ RD-	70	12,9	0,56	0,28	0,27
<b>Ingleses</b> HUDSON et al 2001b		DM2+IAM+	51	19	0,19	0,072	0,056
		DM2+IAM-	107	17	0,17	0,054	<b>0,033</b>
		DM2-IAM+	160	16	0,18	0,054	<b>0,030</b>
		CTRL	199	18	0,087	<b>0,021</b>	<b>0,008</b>
<b>Chineses</b> JIXIONG et al 2003		DM2+R+	205	9,9	0,97	0,57	0,59
		DM2+R-	152	12,2	0,55	0,24	0,21
		DM2-	212	12,7	0,50	0,20	0,16
<b>Finlandeses</b> PETERSSON-FERNHOLM et al 2003.		DM1+	996	2	<b>&lt;0,00001</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,00001</b>

P\* comparações pelo teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ )

+: presença; - : ausência

§ Frequência do alelo C obtida neste trabalho (Tabela 14)

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; CTRL; grupo controle.

NP: nefropatia; IAM: infarto agudo do miocárdio; R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa,

DCI: Doença cardíaca isquêmica, CP: complicações de pele associadas à microangiopatia

diabética;  $\mu$ Alb: microalbuminúria; DAC: doença arterial coronariana.



No estudo comparativo apresentado na Tabela 25 dois pontos podem ser destacados. Primeiro, as frequências alélicas para a população chinesa não diferem ( $P \geq 0,16$ ) daquelas descritas para as amostras brasileiras. Nos estudos de polimorfismos genéticos, incluindo o próprio RAGE, as frequências genotípicas e alélicas observadas em orientais são frequentemente diferentes das observadas na população brasileira. O segundo ponto de destaque é a significativa diferença na frequência do alelo C observada na comparação entre indivíduos com *Diabetes mellitus* tipo 1 (19%) e os grupos DM2+DAC+ (8%) e DAC+ (8%) deste trabalho ( $P=0,026$  e  $0,022$ , respectivamente) descritos por PICHETH *et al* 2007 e o grupo DM1 de Finlandeses (2%) descrito por PETTERSSON-FERNHOLHM *et al* 2003, sugerindo uma associação entre alelo e a presença de diabetes tipo 1. Esta observação conduziu a estudar a associação deste polimorfismo em indivíduos portadores de diabetes tipo 1, cujos resultados estão discutidos no item 6.6 deste trabalho.

#### **6.2.1.2 Polimorfismo -374T>A da região promotora de RAGE**

A Tabela 04 mostra as frequências genotípicas e alélicas observadas em diversas populações para o polimorfismo -374T>A. A distribuição das frequências genotípicas está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos estudados no presente trabalho (Tabela 15). Os resultados não foram significativamente diferentes para as distribuições genotípicas ( $P \geq 0,22$ ) ou alélicas ( $P \geq 0,72$ ) entre os grupos estudados. Portanto, não foi observada associação entre o polimorfismo -374T>A da região promotora de RAGE com a DAC na presença ou ausência do *Diabetes mellitus* tipo 2. A comparação dos dados com outros estudos para este polimorfismo está mostrado na Tabela 26.

A frequência do alelo -374A é significativamente maior ( $P=0,04$ ) nos Euro-Brasileiros quando comparados aos Afro-brasileiros (TORRES 2007). SANTOS *et al* 2005 que estudaram pacientes com diabetes tipo 2 também

mostraram a diferença entre Euro- (31%) e Afro-Brasileiros (24%) para o alelo A (Tabela 04, Revisão Bibliográfica). Estes autores também reportam que a frequência do alelo -374A está inversamente associada com o risco para a doença cardíaca isquêmica em indivíduos Afro-Brasileiros com diabetes tipo 2.

Os resultados deste trabalho mostram uma diferença significativa na frequência do alelo A com aquele descrito por SANTOS et al (2005) para Afro-Brasileiros (18%) com doença cardíaca isquêmica associada ao diabetes (DM2+DCI+) quando comparados com os grupos DM2+DAC+ (31%) e DAC+

Tabela 26. Comparações entre as frequências do alelo A do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE nos grupos estudados e reportados na literatura.

Grupo étnico	literatura	características	n	Alelo (%)	Frequência do alelo (%)		
					P*		
				A	CTRL (31) §	DM2+DAC+ (31) §	DAC+ (33) §
<b>Euro-Brasileiros</b> <b>Afro-Brasileiros</b> SANTOS <i>et al</i> 2005.		DM2+	520	31	0,97	0,99	0,66
		DM2+	183	24	0,26	0,22	0,076
		DM2+DCI+	75	18	0,052	<b>0,044</b>	<b>0,015</b>
		DM2+DCI-	56	31	0,96	0,93	0,73
<b>Brasileiros</b> TORRES, <i>et al</i> 2007, Dados não publicados		Euro-Brasileiros saudáveis	62	35	0,56	0,57	0,72
		Afro-Brasileiros saudáveis	65	23	0,30	0,28	0,15
<b>Euro-Brasileiros</b> PICHETH <i>et al</i> 2007		DM1+	102	33	0,71	0,74	0,94
<b>Tchecos</b> KANKOVÁ <i>et al</i> , 2005		DM2-	228	34,4	0,58	0,59	0,79
		DM2+ ND+	198	37,6	0,30	0,30	0,39
		DM2+ ND-	179	34,9	0,55	0,56	0,27
<b>Eslovenos</b> KIRBIS <i>et al</i> , 2004.		DM2- DAC-	241	31,8	0,84	0,88	0,85
		DM2+ DAC+	168	32,8	0,76	0,78	0,98
<b>Eslovenos</b> GLOBOCNICK <i>et al</i> , 2003		DM2- RD+	116	33,2	0,68	0,70	0,98
		DM2+ RD-	70	37,1	0,41	0,42	0,54
<b>Italianos</b> FALCONE <i>et al</i> 2005		DAC+	234	34,5	0,53	0,55	0,73
<b>Finlandeses</b> PETTERSSON-FERNHOLM <i>et al</i> 2003.		DM1+	85	13	<b>&lt;0,00001</b>	<b>&lt;0,00001</b>	<b>&lt;0,00001</b>
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> 2001b		DM2+IAM+	51	17	0,09	0,08	<b>0,039</b>
		DM2+IAM-	107	19	0,08	0,067	<b>0,019</b>
		DM2-IAM+	160	22	0,14	0,11	<b>0,031</b>
		CTRL	199	20	0,058	<b>0,044</b>	<b>0,007</b>
<b>Chineses</b> JIXIONG <i>et al</i> 2003		DM2+R+	205	13,6	<b>0,0014</b>	<b>0,0008</b>	<b>&lt;0,00001</b>
		DM2-R+	152	12,7	<b>0,0008</b>	<b>0,0005</b>	<b>&lt;0,00001</b>
		DM2-	212	13,9	<b>0,0008</b>	<b>0,0005</b>	<b>&lt;0,00001</b>

P\* comparações pelo teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ )

+: presença; - : ausência

§ Frequência do alelo A obtida neste trabalho (Tabela 15)

DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; CTRL; grupo controle.

NP: nefropatia; IAM: infarto agudo do miocárdio; R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa,

DCI: Doença cardíaca isquêmica; CP: complicações de pele associadas à microangiopatia

diabética;  $\mu$ Alb: microalbuminúria; DAC: doença arterial coronariana.

(33%). Também o grupo DAC+ tem frequência significativamente maior do alelo A quando comparado com Ingleses com diabetes tipo 2 na presença ou ausência de infarto agudo do miocárdio (17 a 19%) descritos por HUDSON *et al* (2001 b) e Chineses na presença ou ausência do diabetes tipo 2 (~13%) descritos por JIXIONG *et al* (2003). Finlandeses com diabetes tipo 1 (PETTERSSON-FERNHOLM *et al* 2005) apresentaram a frequência do alelo A (13%) significativamente menor ( $P < 0,0001$ ) que diabéticos tipo 1 brasileiros (33%) estudados pelo nosso grupo de pesquisa (HEIDEMANN 2006), bem como para todos os grupos analisados neste trabalho ( $P < 0,0001$ ).

PETTERSSON-FERNHOLM *et al* (2005) foram os primeiros a evidenciar que a presença do alelo -374A em homozigose (-374AA) estava associada com uma redução na frequência de DAC e infarto agudo do miocárdio em indivíduos Finlandeses com diabetes tipo 1. Posteriormente, FALCONE *et al* (2004 e 2005) associaram o alelo -374AA como fator de proteção para DAC e infarto agudo do miocárdio em uma população italiana. Efeito similar ao já descrito anteriormente por SANTOS *et al* (2005) para Afro-Brasileiros. Estes estudos motivaram a procurar o efeito protetor do alelo -374A em nossa amostra, análises que serão apresentadas em detalhes na sequência deste trabalho.

No entanto, outros estudos conduzidos por KANKOVÁ *et al* (2005), KIRBIS *et al* (2004), GLOBOCNICK *et al* (2003), HUDSON *et al* (2001 a; 2001 b) e JIXIONG *et al* (2003) não evidenciaram associação deste polimorfismo com diabetes tipo 2 e suas complicações (Tabela 04). Deve ser considerado, no entanto, que os estudos supra citados não analisaram isoladamente o efeito do alelo -374A em homozigose.

### **Desequilíbrio de ligação -429T>C e -374T>A.**

A análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A para os três grupos em estudo (Tabela 18) mostra completo desequilíbrio entre os polimorfismos ( $D' = 100\%$ ), com o haplótipo -429C/-374A não sendo encontrado na amostra estudada. O desequilíbrio de ligação observado

entre estes polimorfismos é corroborado por outros autores em diversas populações (HUDSON *et al*, 2001 a; PETTERSSON-FERNHOLM *et al* 2003; SANTOS *et al* 2005; LAKI *et al* 2007). Este resultado sugere que os alelos -429C e -374A não ocorrem concomitantemente na mesma fita de DNA.

#### **6.2.1.3 Deleção de 63 pb da região promotora de RAGE**

As frequências genótípicas e alélicas para a deleção de 63 pb (63Del) da região promotora de RAGE não foram significativamente diferentes ( $P \geq 0,07$ ) entre os grupos (Tabela 16). As frequências de heterozigotos para a deleção (1,4 a 3,7%) mostraram que a frequência do heterozigoto I/D neste estudo não diferiu daquelas descritas para Euro-Brasileiros (3,5%) e foram significativamente menores ( $P < 0,01$ ) quando comparadas a Afro-Brasileiros (8,7%) em estudo de SANTOS *et al* (2005). TORRES (2007) reporta frequências do heterozigoto I/D de 0% e 7,1%, para Euro- e Afro-Brasileiros, respectivamente, em concordância com o descrito neste trabalho. HUDSON *et al* (2002) sugerem que a frequência do heterozigoto I/D seja próxima a 1%. A baixa frequência desta mutação não permitiu análises de associação com poder discriminatório adequado devido ao tamanho amostral utilizado. O tamanho da amostra, relativamente pequeno, para o estudo de frequência da 63Del é sugerido como o responsável pelo significativo desequilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,0003$ ) observado no grupo DM2+DAC+ devido à presença de um indivíduo homozigoto, o único detectado em toda a amostra.

#### **6.2.1.4 Polimorfismo G82S do exon 3 de RAGE.**

A transição guanina para adenina (G→A) na posição nt555, pertencente ao exon 3 do gene RAGE, promove a troca de uma glicina por serina na posição

82 da proteína RAGE. A região codificada pelo exon 3 é apontada como o sítio de ligação de AGEs ao receptor RAGE. Portanto esta mutação não-sinônima tem o potencial de alterar a capacidade ligante do RAGE aos AGEs. Os dados deste trabalho não mostraram diferenças significativas nas frequências genotípicas ( $P>0,16$ ) ou alélicas ( $P>0,13$ ) entre os grupos estudados (Tabela 17). A comparação da frequência do alelo S com outros estudos está mostrada na Tabela 27.

TORRES (2007) reportou que Euro- e Afro-Brasileiros não diferem nas frequências alélicas, respectivamente 2,4 e 0,7% ( $P=0,34$ ), para o polimorfismo *G82S*, valores que também não diferem dos descritos neste trabalho ( $P\geq 0,28$ ).

NAKA *et al* (2006) demonstraram que as frequências genotípicas e alélicas não diferem significativamente ( $P>0,05$ ) entre diabéticos tipo 2, diabéticos tipo 1 e um grupo não-diabético, em uma população brasileira. Os resultados são similares aos observados neste trabalho ( $P>0,05$ ).

A frequência do alelo S foi significativamente ( $P<0,05$ ) menor no grupo DAC+ (2%) quando comparado ao grupo não-diabético de Asiáticos (8%) descrito por HUDSON *et al* (2001 a); com Indianos diabéticos sem retinopatia (11%; DM2+R-) descrito por KUMARAMANICKAVEL *et al* (2002.) e com o grupo DM2+CAD+ de Finlandeses (PULKKINEN *et al* 2001).

Orientais apresentam a frequência do alelo S superior às demais populações analisadas, incluindo as descritas neste trabalho. Chineses (~20%) descritos por LIU *et al* (1999) e Japoneses (~13%) estudados por YOSHIOKA *et al* (2005a) apresentam a frequência do alelo S cerca de 10 e 7 vezes superiores às descritas neste trabalho, respectivamente.

Tabela 27. Comparações entre as frequências do alelo S do polimorfismo G82S da região do exon 3 do gene RAGE nos grupos estudados e reportados na literatura.

Grupo étnico	literatura		Alelo (%)	Frequência do alelo (%)		
	características	n		P*		
			S	CTRL (2) §	DM2+DAC+ (4) §	DAC+ (2) §
<b>Asiáticos</b>	DM2–	156	8	0,15	0,31	<b>0,022</b>
<b>Ingleses</b>	DM2–	196	6	0,36	0,55	0,07
<b>Ingleses</b> HUDSON <i>et al</i> , 1998	DM2+	258	4	0,74	0,83	0,28
<b>Tchecos</b>	CTRL	90	0	0,22	0,06	0,17
KANKOVÁ <i>et al</i> , 1999	DM2+ CP+	88	5,1	0,68	0,96	0,27
	DM2+ RP+	49	2,4	0,87	0,47	0,99
	Psoríase	142	2,8	0,82	0,52	0,66
<b>Chineses</b>	DM2–	104	23,1	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0002</b>	<b>&lt;0,0001</b>
LIU <i>et al</i> , 1999.	DM2+	156	17,7	<b>0,0003</b>	<b>0,0022</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Finlandeses</b>	DM2– CAD+	308	6	0,22	0,59	0,07
PULKKINEN <i>et al</i> , 2000.	DM2+ CAD+	206	7	0,15	0,42	<b>0,038</b>
	CTRL	82	4	0,66	0,81	0,46
<b>Dinamarqueses</b>	DM1+ NP+	199	3,5	0,65	0,72	0,41
POIRIER <i>et al</i> , 2001	DM1+ NP–	193	4,7	0,40	0,92	0,19
<b>Indianos</b>	DM2+ R+	100	5,5	0,25	0,62	0,10
KUMARAMANI CKAVEL <i>et al</i> , 2002	DM2+ R–	100	11	<b>0,03</b>	0,09	<b>0,003</b>
	CTRL	50	2	0,86	0,46	0,99
<b>Japoneses</b>	DM2+ µAlb+	116	14,2	<b>0,007</b>	<b>0,023</b>	<b>0,0002</b>
YOSHIOKA <i>et al</i> , 2005 a	DM2+ µAlb–	232	12,3	<b>0,008</b>	<b>0,038</b>	<b>0,0005</b>
<b>Brasileiros</b>	CTRL	82	1,8	0,99	0,48	0,84
NAKA <i>et al</i> , 2006.	DM2+	147	1,0	0,26	0,052	0,32
	DM1+	105	1,0	0,41	0,13	0,50
<b>Brasileiros</b>	Euro-Brasileiros Saudáveis	62	2,4	0,72	0,34	0,84
TORRES, 2007.	Afro-Brasileiros Saudáveis	70	0,7	0,64	0,28	0,75
<b>Norte Americanos</b> HOFMANN <i>et al</i> , 2005	DM2+ DM2– (toda a amostra)	1632	3,95	0,62	0,65	0,34

P\* comparações pelo teste do Chi-quadrado ( $\chi^2$ )

+: presença; – : ausência

§ Frequência do alelo S obtida neste trabalho (Tabela 17)

DM2: Diabetes mellitus tipo 2; DM1: Diabetes mellitus tipo 1; CTRL; grupo controle.

NP: nefropatia; R: retinopatia; RP: retinopatia proliferativa; CP: complicações de pele associadas à microangiopatia diabética; µAlb: microalbuminúria; DAC: doença arterial coronariana.

Os demais estudos utilizados na comparação, compreendendo as populações Inglesa, Tchecoslovaca, Dinamarquesa e Norte Americana não apresentaram diferenças significativas com os grupos em estudo.

### 6.3 Análises de PCR-SSCP

O procedimento para detecção de polimorfismos de fita simples mostrou (Figura 12) a alta capacidade de discriminação para o polimorfismo -374 T>A e para a 63Del (Figura 13, linhas 8 e 9). Nas condições empregadas a presença do alelo -429C não alterou o padrão de migração do polimorfismo da região -374 (Figura 12, linha 4). A técnica de PCR-SSCP para detecção de novos polimorfismos apresenta como vantagens a simplicidade de execução e o baixo custo. No entanto a detecção de padrões de migração eletroforética, decorrente da conformação assumida pelas fitas simples de DNA, que caracterizem mutações é dependente de vários fatores (HENNESSY *et al* 1998).

A análise do gel da reação de PCR-SSCP para a região promotora também permitiu a detecção de mutações pela análise dos padrões de heteroduplex. Foram detectados quatro indivíduos com padrões distintos de heteroduplex (exemplos na Figura 13, linhas 2 e 3). As análises de sequenciamento para estas amostras estão em andamento.

Para a região do exon 3 o procedimento de PCR-SSCP empregado permitiu identificar dois perfis eletroforéticos distintos (Figura 14, linhas 1, 2 e 5). Cinco indivíduos foram relacionados com estas alterações na PCR-SSCP e as análises de sequenciamento para estas amostras estão em andamento. Para a região do exon 3 não foram observadas alterações no padrão de heteroduplex.



## 6.4 Análises de correlação e associação

O controle da expressão de RAGE não é totalmente conhecido no momento. Alguns estudos demonstraram que o PPAR $\gamma$  (*peroxisoma proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) reduz a expressão de RAGE, bem como a rosiglitazona, um agonista do PPAR $\gamma$  (WANG *et al* 2006). Os PPARs são moléculas que modulam a função da parede vascular e estão relacionadas ao processo inflamatório e aterogênico. Também, CUCCURULLO *et al* (2006) mostraram que a sinvastatina inibe a expressão de RAGE. Portanto, é relevante buscar associação entre os marcadores de risco para DAC e os polimorfismos de RAGE.

A correlação linear (Pearson) significativa entre os polimorfismos e as variáveis em estudo (Tabela 19) indica que o grupo DM2+DAC+ foi o que apresentou maior número de parâmetros significativamente ( $P < 0,05$ ) correlacionados aos polimorfismos estudados. O polimorfismo G82S foi o que apresentou o maior número de elementos correlacionados. A partir deste estudo preliminar foram analisadas as diferenças entre as concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos significativamente correlacionados com os polimorfismos em estudo (Tabelas 20 e 21).

### Associação com -374T>A

Para o grupo DM2+DAC+ (Tabela 20) com o polimorfismo -429T>C o conjunto dos genótipos que contêm o alelo C (TC+CC) mostrou concentração de triglicérides significativamente menor ( $P = 0,03$ ) quando comparada ao genótipo TT. Para o polimorfismo -374T>A, os portadores do alelo A (TA+AA) apresentaram maior concentração de HDL-C, sugerindo que a presença do alelo A possa estar inversamente associado ao risco de DAC, como sugerido por outros autores (FALCONE *et al* 2004; FALCONE *et al* 2005; SANTOS *et al* 2005).

No grupo DAC+ (Tabela 21), somente o polimorfismo -374T>A evidenciou associação significativa. As concentrações de triglicérides foram significativamente ( $P = 0,003$ ) menores para o conjunto dos genótipos com a

presença do alelo A (TA+AA) quando comparado com o genótipo TT bem como o indicador de risco para DAC,  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$  menor na presença do alelo A. Como discutido anteriormente para o grupo DM2+DAC+ para o mesmo polimorfismo, os indivíduos que apresentam o alelo A mostram um menor risco para DAC.

### **Associação com G82S**

No grupo que contempla diabéticos, para o polimorfismo G82S, os indivíduos que apresentam o alelo S (82S) mostraram concentrações significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) de colesterol total, LDL-C, triglicérides e de AGEs fluorescentes no soro. Todos estes fatores alterados elevam o risco para a doença cardiovascular. Estudos em células de ovário de hamster Chinês (CHO) transfectadas isoladamente com os alelos G (G82) ou S (S82) mostraram que a isoforma S (S82) do RAGE apresenta maior afinidade por AGEs ou S100A12 e aumento na ativação de proteínas associadas ao processo proinflamatório (HOFMANN et al 2003). Portanto, os portadores do alelo S do polimorfismo G82S parecem ser mais susceptíveis a risco de DAC pela maior ativação do processo proinflamatório. JANG *et al* (2007) mostraram uma associação do alelo S (em homozigose) com o aumento de fatores de risco (concentração de sRAGE, AGEs, proteína C reativa, fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) para a doença cardiovascular em uma população coreana não obesa e sem diabetes.

Múltiplos fatores além dos polimorfismos em estudo podem afetar as concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos analisados. As drogas hipolipemiantes, anti-hipertensivas e hipoglicemiantes intensamente utilizadas pelos pacientes na amostra em estudo podem interferir nas análises e na interpretação das associações dos parâmetros bioquímicos com os polimorfismos do gene RAGE. Outro elemento que precisa ser considerado é o tamanho da amostra, que pela baixa frequência de alguns polimorfismos pode afetar a interpretação dos resultados.

Os resultados dos ensaios de correlação e associação mostraram que os polimorfismos do gene RAGE em estudo estão associados com as concentrações séricas do perfil lipídico. As evidências mais fortes sugerem que o alelo -374A está associado a menor risco de DAC, enquanto os portadores do alelo S (82S) estão associados a maior risco para DAC.

No presente não há como determinar se os efeitos dos polimorfismos sobre os marcadores bioquímicos são provenientes da ação direta de RAGE ou refletem uma resposta complexa de múltiplos elementos onde o RAGE é apenas coadjuvante.

#### **6.4.1 Associação dos polimorfismos de RAGE com as concentrações de Hemoglobina Glicada em diabéticos.**

A hemoglobina glicada (HbA<sub>1C</sub>) é um marcador do controle glicêmico em diabéticos. A HbA<sub>1C</sub> reflete a ligação não-enzimática entre a glucose e a cadeia  $\beta$  da hemoglobina A sendo caracterizada como um produto de glicação precoce.

Poucos estudos relacionando a associação entre os polimorfismos de RAGE estão disponíveis. PETTERSSON-FERNHOLM *et al* (2003) associaram o alelo -374A em pacientes diabéticos tipo 1 com controle glicêmico inadequado (HbA<sub>1C</sub> >9,5%) como um fator de proteção contra proteinúria e LAKI *et al* (2007) evidenciaram que diabéticos tipo 1 portadores dos genótipos -429TC+CC apresentaram concentrações de HbA<sub>1C</sub> maiores que os -429TT.

As concentrações de HbA<sub>1C</sub> nos grupos DM2+DAC+ e DAC+ não apresentaram associação com os polimorfismos em estudo (Tabela 22).

Quando os pacientes do grupo DM2+DAC+ foram separados conforme as concentrações de HbA<sub>1C</sub> que refletem controle glicêmico adequado ( $\leq 7,0\%$ ), moderado ( $>7,0 < 8,0\%$ ) e inadequado ( $\geq 8,0\%$ ) e associados aos polimorfismos de RAGE em estudo (Tabela 23), nenhuma associação foi observada ( $P > 0,27$ ).

Portanto, é possível concluir que para a amostra em estudo, os polimorfismos de RAGE não afetam o controle glicêmico em pacientes diabéticos.

### **6.5. Polimorfismo -374T>A e severidade da DAC**

Os grupos DM2+DAC+ e DAC+ foram analisados para o polimorfismo -374 T>A comparando indicadores de severidade da doença coronariana com a presença do alelo -374A em homozigose com os demais genótipos deste polimorfismo (Tabela 23). O grupo que congrega pacientes diabéticos, DM2+DAC+ mostrou para os marcadores de severidades estudados – número de vasos lesados, índice de severidade de Duke e distribuição dos vasos lesados – índices significativamente menores ( $P=0,01$ ) relacionados à severidade da DAC quando comparados ao grupo DAC+. Nenhuma associação com a severidade da DAC foi observada quando os genótipos AA+TA *versus* TT foram comparados. Portanto, os dados sugerem um efeito protetor do alelo -374A que é evidenciado quando este se apresenta em homozigose e na presença de diabetes tipo 2 associado à DAC.

A associação observada para o genótipo AA com menor número de vasos lesados é comparável com os resultados descritos por FALCONE *et al* (2005) que mostraram o efeito protetor do genótipo AA em Italianos com DAC em uma amostra contendo 15% de diabéticos tipo 2. Uma frequência significativamente maior do genótipo AA também foi associada com a menor frequência de doença cardiovascular, doença arterial coronariana ou infarto do miocárdio em Finlandeses com diabetes tipo 1 (PETTERSSON-FERNHOLM *et al* 2003). O alelo -374A também foi associado com menor risco de doença cardíaca isquêmica em uma população Afro-Brasileira com diabetes tipo 2 (SANTOS *et al* 2005).

A razão para o observado efeito protetor relacionado à presença em homozigose do alelo -374A não é conhecida. Foi sugerido que esta proteção poderia estar relacionada à redução na expressão de RAGE (PETTERSSON-

FERNHOLM et al 2003; FALCONE et al 2004), interligada ao mecanismo de reparo vascular que leva à estenose progressiva (FALCONE et al 2005) e ao desequilíbrio de ligação com uma região adjacente associada com as complicações do diabetes (SANTOS et al 2005).

Estudos prévios descreveram que a interação de RAGE com um ligante, como os produtos de glicação avançada (AGEs), resulta em ativação da cascata de sinalização e na transcrição do gene RAGE (SCHMIDT et al 2001). Portanto, a ativação deste receptor leva a uma retro-alimentação positiva que aumenta o número de receptores sobre a superfície celular, consequentemente promovendo ampliação dos efeitos de RAGE (PULLERITS et al 2005).

YONEKURA et al (2005), analisando células do endotélio vascular, mostraram que o RNA mensageiro para RAGE nestas células correspondia a 31% para a proteína RAGE integral, 31% para a forma N-truncada e 38% para a forma solúvel (sRAGE).

HUDSON et al (2001) mostraram que a mutação -374 A da região promotora de RAGE leva a um aumento na transcrição *in vitro*, sugerindo que os portadores homozigotos do genótipo AA apresentem um aumento na expressão de RAGE. Então, um aumento na transcrição de RAGE devido ao alelo -374A em homozigose aumentaria consideravelmente a concentração de RAGE solúvel e da forma N-truncada na superfície da célula endotelial. Tem sido demonstrado que o aumento no nível de RAGE solúvel parcialmente neutraliza o efeito dos AGEs e outras moléculas ligantes de RAGE, provavelmente por impedir que estas moléculas atinjam o receptor RAGE na membrana iniciando uma resposta inflamatória (PULLERITS *et al* 2005; FALCONE *et al* 2005b).

Como hipótese, propomos que o efeito protetor do polimorfismo -374AA possa ser determinado pelo aumento na síntese de RAGE solúvel induzido pelo aumento de expressão da proteína RAGE associado com este genótipo. Embora não se tenha evidências de que este polimorfismo tenha um efeito diferencial sobre as concentrações de uma isoforma de RAGE, o RAGE solúvel poderia ser gerado também pela clivagem e liberação da proteína RAGE ligado à membrana,

por metaloproteinases da matriz e/ou outras variantes de RAGE como proposto por HUDSON *et al* (2005c).

Recentemente a presença da deleção de 63pb da região promotora foi associada com proteção em relação à nefropatia diabética em diabéticos tipo 2 (RUDOFISKY *et al* 2004). Esta mutação rara que também aumenta a transcrição de RAGE *in vitro* (HUDSON *et al* 2001) pode servir como suporte relacionando que uma expressão anômala de RAGE pode estar associada com as complicações do diabetes.

Estes dados, portanto, indicam um efeito protetor associado ao polimorfismo -374AA em diabéticos tipo 2 em relação à severidade da DAC.

#### **6.6 Polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora de RAGE em diabéticos tipo 1.**

A associação dos polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora de RAGE com o *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) foi explorada analisando amostras cedidas pelo Departamento de Genética da UFPR (Tabela 24). Neste estudo foram observadas diferenças significativas ( $P<0,001$ ) nas frequências genotípicas e alélicas entre um grupo controle não diabético e o grupo DM1 (PICHETH *et al* 2007). As distribuições genotípicas estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos estudados. A frequência do alelo C em pacientes com DM1 foi cerca de 2 vezes superior ao grupo controle (10% vs. 19%, respectivamente). Este resultado abre novas possibilidades para a utilização do polimorfismo -429T>C como marcador de risco em estudos de associação com doenças.

Somente um estudo com diabéticos tipo 2 conduzido por HUDSON *et al* (2001a) havia descrito associação do alelo C com a retinopatia diabética (Tabela 03, Revisão Bibliográfica). Todos os demais falharam em demonstrar com este alelo associações com doenças.

LAKI *et al* (2007) sugerem que o alelo -429C de RAGE pode ser considerado como um candidato a membro do haplótipo ancestral 8.1 (8.1 HA). Este haplótipo, que envolve genes relacionados ao sistema maior fé histocompatibilidade, está associado com várias imunopatologias e doenças autoimunes incluindo o *Diabetes mellitus* tipo 1 (CANDORE *et al* 2002).

O polimorfismo -374T>A não apresentou associação com o diabetes tipo 1 ( $P=0,81$ ) na população estudada. Nosso resultado é diferente daquele descrito por LINDHOLM *et al* (2006) que mostraram associação entre o polimorfismo -374T>A com a nefropatia diabética em diabéticos tipos 1 e 2 de origem Escandinava. As diferenças entre as composições étnicas podem explicar as diferenças entre estes resultados.

## 7. Conclusões

- O índice aterogênico do soro, caracterizado pela relação  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ , foi o marcador que melhor discriminou entre os grupos de pacientes estudados, sendo sugerida sua utilização na rotina laboratorial.
- As concentrações de hemoglobina glicada ( $\text{HbA}_{1\text{C}}$ ) em indivíduos do grupo DM2+DAC+ não apresentaram correlação ou associação com os polimorfismos do gene RAGE estudados
- Na população estudada (95% Euro-brasileiros) as frequências alélicas e genótípicas para os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del e *G82S* são similares às descritas para outras populações caucasóides e diferem significativamente daquelas descritas para orientais.
- Os polimorfismos -429T>C, -374T>A, 63Del e *G82S* não estão associados à doença arterial coronariana na presença ou ausência do diabetes tipo 2.
- Os indivíduos com o genótipo *G82S* (GS) no grupo DM2+DAC+ apresentaram concentrações de marcadores de risco para DAC (colesterol total, LDL-C, TG e  $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ ) e AGEs fluorescentes no soro significativamente maiores que aqueles de genótipo *G82G* (GG), sugerindo que os portadores da substituição que introduz uma serina no códon 82 da proteína RAGE possam ser mais susceptíveis à doença cardiovascular.



- O genótipo -374AA da região promotora de RAGE esta associado a menor severidade para a doença arterial coronariana em indivíduos com diabetes tipo 2, sugerindo que o alelo -374A em homozigose é um fator de proteção em relação à severidade da doença arterial coronariana.
- O polimorfismo -429T>C da região promotora de RAGE esta associado com o *Diabetes mellitus* tipo 1 na população brasileira, com o alelo C apresentando um aumento de cerca de 2 vezes quando comparado com indivíduos não diabéticos.

## Referências Bibliográficas

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras Cardiol.** V. 88 (supp I), 2007.

AGALOU, S.; AHMED, N.; DAWNAY, A.; THORNALLEY, P.J. Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, p. 1394-1396, 2003.

AHMED, M.U., FRYE, E.B., DEGENHARDT, T.P.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W. N<sup>ε</sup>-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. **Biochem. J.**, v. 324, p. 565-570, 1997.

AHMED, N.; ARGIROV, O.K.; MINHAS, H.S.; CORDEIRO, C.A.A.; THORNALLEY, P.J. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N<sub>ε</sub>-carboxymethyl-lysine- and N<sub>ε</sub>-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.**, v. 364, p. 1-14, 2002.

AMANO, S.; KAJI, Y.; OSHIKA T.; OKA, T.; MACHINAMI, R.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S. Advanced glycation end products in human optic nerve head. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, p. 52-55, 2001.

AMBROSE, J.A.; BARUA, R.S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. An update. **J. Am. College Cardiol.**, v. 43, p.1731-1737, 2004.

American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**; v.29, p.S43-S48, 2007.

ANDERSON, M.M.; REQUENA, J.R.; CROWLEY, J.R.; THORPE, S.R.; HEINECKE, J.W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 103 -108, 1999.

ANDO, K.; BEPPU, M.; KIKUGAWA, K.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S. Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 258, p. 123-127, 1999.

ARAKI, N.; UENO, N.; CHAKRABARTI, B.; MORINO, Y.; HORIUCHI, S. Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10211-10214, 1992.

ARAKI, T.; CHIJIWA, Y.; NAGAI, R.; ARAKI, N.; HORIUCHI, S. Application of the amino acid analysis for the detection of AGE-proteins of the Maillard reaction. **Int. Congress Series**, v. 1245, p. 391-393, 2002.

ARONSON, D.; RAYFIELD, E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiovascular Diabetol.**, v.1, p. 1-10, 2002.

ASIF, M.; EGAN, J.; VASAN, S.; JYOTHIRMAYI, G.N.; MASUREKAR, M.R.; LOPEZ, S.; WILLIAMS, C.; TORRES, R.L.; WAGLE, D.; ULRICH, P.; CERAMI, A.; BRINES, M. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, p. 2809-2813, 2000.

AUER, J.; WEBER, T.; BERENT, R.; LASSNIG, E.; MAURER, E.; LAMM, G.; KVAS, E.; EBER, B. Obesity, body fat and coronary atherosclerosis. **Int. J. Cardiol.**, v.98, p. 227-235, 2005.

BÄR, K.J.; FRANKE, S.; WENDA, B.; MÜLLER, S.; KIENTSCH-ENGEL, R.; STEIN, G.; SAUER, H. Pentosidine and N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. **Neurobiol. Aging**, v. 24, p. 333-338, 2003.

BASTA G, SCHMIDT AM, CATERINA RD. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovasc Res**; 63: 582-92, 2004

BAYNES, J.W. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 41, p. 1159-1165, 2003.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. **Free Radical Biol. Med.**, v. 28, p. 1708-1716, 2000.

BERG, T.J.; SNORGAARD, O.; FABER, J.; TORJESSEN, P.A. Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1186-1190, 1999.

BIDASEE, K.R.; NALLANI, K.; YU, Y.; COCKLIN, R.R.; ZHANG, Y.; WANG, M.; DINCER, Ü.D.; BESCH JR., H.R. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. **Diabetes**, v. 52, p. 1825-1836, 2003.

BIEMEL, K.M.; FRIEDL, A.; LEDERER, M.O. Identification and quantification of major Maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 24907 – 24915, 2002.

BIONDI-ZOCCAI, G.G.L.; ABBATE, A.; LIUZZO, G.; BIASUCCI, L.M. Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 41, p. 1071-1077, 2003.

BLOOMGARDEN, Z.T. European association for the study of diabetes annual meeting, 2000. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1115-1135, 2001.

BLOOMGARDEN, Z.T. American Diabetes Association annual meeting, 1999: dyslipidemia, endothelial dysfunction, and glycosylation. **Diabetes Care**, v. 23, p.690-8, 2000.

BONNARDEL-PHU, E.; WAUTIER, J.L.; SCHMIDT, A.M.; AVILA, C.; VICAUT, E. Acute modulation of albumin microvascular leakage by advanced glycation end products in microcirculation of diabetic rats in vivo. **Diabetes**, v.48, p.2052-2058, 1999.

BOOTH, A.A.; KHALIFAH, R.G.; TODD, P.; HUDSON, B.G. *In vitro* kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). **J. Biol. Chem.**, v.272, p. 5430-5437, 1997.

BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annu. Rev. Med.**, v.46, p. 223-234, 1995.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A. e VLASSARA, H. Advanced glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetes complication. **N. Engl. J. Med.**, v.318, p. 1315 – 1321, 1988.

BUONGIORNO, A.M.; SAGRATELLA, E.; MORELLI, S.; BJERRUM, O.J.; MAROCCIA, E.; MORANO, S.; FALLUCCA, F.; Di MARIO, U.; SENSI, M. Two polyclonal antisera detect different AGE epitopes in human plasma samples. **Immunol. Lett.**, v.85, p. 2434-249, 2003.

CASTELLANI, R.J.; HARRIS, P.L.R.; SAYRE, L.M.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N.; VITEK, M.P.; FOUNDS, H.; ATWOOD, C.S.; PERRY, G.; SMITH, M.A. Active glycation in neurofibrillary pathology of Alzheimer disease: N<sup>c</sup>-(carboxymethyl)lysine and hexitol-lysine. **Free Radical Biol. & Medicine**, v.31, p. 175-180, 2001.

CASTELLI, W.P.; ABBOTT, R.D.; McNAMARA, P.M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary artery disease. **Circulation**, v.67, p.730-734, 1983

CHAPPEY, O.; DOSQUET, C.; WAUTIER, M.P.; WAUTIER, J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.27, p.97-108, 1997.

CHELLAN, P.; NAGARAJ, R.H. Early glycation products produce pentosidine cross-links on native proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 3895-3903, 2001.

CHELLAN, P.; NAGARAJ, R.H. Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 368, p. 98-104, 1999.

CHEN, J. R.; TAKAHASHI, M.; SUZUKI, M.; KUSHIDA, K.; MIYAMOTO, S.; INOUE, T. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology**, v.38, p. 1275-1278, 1999.

CLOOS, P.A.C.; CHRISTGAU, S. Non-enzymatic covalent modifications of proteins: mechanisms, physiological consequences and clinical applications. **Matrix Biol.**, v.21, p. 39-52, 2002.

COCKLIN, R.R.; ZHANG, Y.; O'NEILL, K.D.; CHEN, N.X.; MOE, S.M.; BIDASEE, K.R.; WANG, M. Identity and localization of advanced glycation end products on human  $\beta_2$ -microglobulin using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v.314, p. 322-325, 2003.

COOPER, M.E.; BONNET, F.; OLDFIELD, M.; JANDELEIT-DAHLM, K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. **Am. J. Hypertension**, v.14, p. 475-486, 2001.

CUCCURULLO, C. IEZZI, A.; FAZIA, M.L.; CESARE, D.D.; FRANCESCO, A.D.; MURARO, R.; BEI, R.; UCCHINO, S.; SPIGONARDO, F.; CHIARELLI, F.; SCHMIDT, A.M.; CUCCURULLO, F.; MEZZETTI, A.; CIPOLLONE, F. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., V.26, P.2716-2723, 2006.

CUSSIMANIO, B.L.; BOOTH, A.A.; TODD, P.; HUDSON, B.G.; KHALIFAH, R.G. Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. **Biophys. Chem.**, v. 105, p. 743-755, 2003.

DOBIÁSOVÁ, M. FROHLICH, J. The plasma parameter log(TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER<sub>HDL</sub>). **Clin. Biochem.**, v.34, p.583-588, 2001.

DOEVENDANS, P.A.; JUKEMA, W.; SPIERING, W.; DEFESCHE, J.C.; KASTELEIN, J.J.P. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. **Int. J. Cardiol.**, v.80, p. 161-172, 2001.

EBLE, A.S.; THORPE, S.R. e BAYNES, J.W. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.258, p.9406 – 9412, 1983.

EHTISHAM, A.; CHIMOWITZ, M.I.; FURLAN, A.J.; LAFRANCHISE, E.F. Systemic risk factors associated with progression of atherosclerosis from the coronary to the carotid arteries. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**, v.14, p. 182-185, 2005.

FALCONE C, CAMPO I, EMANUELE E, BUZZI MP, ZORZETTO M, SBARSI I, CUCCIA M. Relationship between the -374 T/A gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. **Int. J. Mol. Med.**, v.14, p.1061-1064, 2004.

FALCONE C, CAMPO I, EMANUELE E, BUZZI MP, GEROLDI D, BELVITO C, ZORZETTO M, SBARSI I, CUCCIA M. -374T/A polymorphism if the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Clin. Chim. Acta**; 354:111-6, 2005

FALCONE C, EMANUELE E, D'ANGELO A, BUZZI MP, BELVITO C, CUCCIA M, GEROLDI D. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**; v.25, p.1032-1037, 2005b.

FARBOUD, B.; AOTAKI-KEEN, A.; MIYATA. T.; HJELMELAND, L.M.; HANDA, J.T. Development of a polyclonal antibody with broad epitope specificity for advanced glycation endproducts and localization of these epitopes in a bruch's membrane of the aging eye. **Mol. Vision.**, v.5, p. 1-6, 1999.

FINKELSTEIN, A.; MCCLEAN, D.; KAR, S.; TAKIZAWA, K.; VARGHESE, K.; BAEK, N.; PARK, K.; FISHBEIN, M.C.; MAKKAR, R.; LITVACK, F.; EIGLER, N.L. Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. **Circulation**, v.107, p.777-784, 2003.

FIORETTO, P.; STEFFES, M.W.; SUTHERLAND, D.E.R.; GOETZ, F.C.; MAUER, M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 69-75, 1998.

FOELL, D.; ICHIDA, F.; VOGL, T.; YU, X.; CHEN, R.; MIYAWAKI, T.; SORG, C.; ROTH, J. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. **Lancet**, v 361, p. 1270-1272, 2003.

FORBES, J.M.; COOPER, M.E.; THALLAS, V.; BURNS, W.C.; THOMAS, M.C.; BRAMMAR, G.C.; LEE, F.; GRANT, S.L.; BURRELL, L.A.; JERUMS, G.; OSICKA, T.M. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.51, p.3274-3282, 2002.

FRANCKE, S.; MANRAJ, M.; LACQUEMANT, C.; LECOEUR, C.; LEPRÊTRE, F.; PASSA, P.; HEBE, A.; CORSET, L.; YAN, S.L.K.; LAHMIDI, S.; JANKEE, S.; GUNNESS, T.K.; RAMJUTTUN, U.S. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p. 2751-2765, 2001.

FROHLICH, J.; DOBIÁSOVÁ, M. Fractional esterification rate of cholesterol and ratio of triglycerides to HDL-cholesterol are powerful predictors of positive findings on coronary angiography. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1873-1880, 2003.

FU, S.; FU, M.X.; BAYNES, J.W.; THORPE, S.R.; DEAN, R.T. Presence of dopa and amino acid hydroperoxides in proteins modified with advanced glycation end products (AGEs): amino acid oxidation products as a possible source of oxidative stress induced by AGE proteins. **Biochem. J.**, v. 330, p. 233-239, 1998.

GAVIN III, J.R. Pathophysiologic mechanisms of postprandial hyperglycemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 88(suppl), p. 4H-8H, 2001.

GERDEMANN, A.; LEMKE, H.D.; NOTHDURFT, A.; HEIDLAND, A.; MUNCH, G.; BAHNER, U.; SCHINZEL, R. Low-molecular but not high-molecular advanced glycation end products (AGEs) are removed by high-flux dialysis. **Clin. Nephrol.**, v. 54, p.276-83, 2000.

GILBERT, R.E.; KELLY, D.J.; ATKINS, R.C. Novel approaches to the treatment of progressive renal disease. **Curr. Opinion Pharmacol.**, v. 1, p. 183-189, 2001.

GROBBEE, D.E.; BOTS, M.L. Statin treatment and progression of atherosclerotic plaque burden. **Drugs**, v. 63, p. 893-911, 2003.

HAMMES, H.-P. Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. **J. Diab. Complications**, v. 17, p. 16 – 19, 2003.

HAUDE, M.; KONORZA, T.F.M.; KALNINS, U.; ERGLIS, A.; SAUNAMÄKI, K.; GLOGAR, H.D.; GRUBE, E.; GIL, R.; SERRA, A.; RICHARDT, H.G.; SICK, P.; ERBEL, R.; Heparin-coated stent placement for the treatment of stenoses in small coronary arteries of symptomatic patients. **Circulation**, v. 107, p. 1265-1270, 2003.

HAYDEN, M.R.; TYAGI, S.C. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. **Nutrition and Metabolism**, v.1, 2004. Disponível em: <<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/1/1/10>> Acessado em: 10 dez 2005.

HENLE, T.; DEPPISCH, R.; BECK, W.; HERGESELL, O.; HÄNSCH, G.M.; RITZ, E. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.14, p. 1968-1975, 1999.

HENNESSY, L.K.; TEARE, J.; KO, C. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of single-strand conformation polymorphism patterns for *BRCA1* mutations. **Clin. Chem.**, v.44, p.879 – 882, 1998.

HOFMANN, M. A.; DRURY, S.; FU, C.; QU, W.; TAGUCHI, A.; LU, Y.; AVILA, C.; KAMBHAM, N.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; NEURATH, M. F.; SLATTERY, T.; BEACH, D.; McCLARY, J.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v.97, p.889-901, 1999.

HOFMANN, M.A.; DRURY, S.; HUDSON, B.I.; GLEASON, M.R.; QU, W.; LU, Y.; LALLA, E.; MONTEIRO, J.; STICKLAND, M.H.; BUCCIARELLI, L.G.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. **Genes Immunity**, v.3, p.123-135, 2003.

HORI, O.; BRETT, J.; SLATTERY, T.; CAO, R.; ZHANG, J.; CHEN, J.X.; NAGASHIMA, M.; LUNDH, E.R.; VIJAY, S.; NITECKI, D.; MORSER, J.; STERN, D.; SCHMIDT, A.M. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.25752-25761, 1995.

HORI, O.; DU YAN, S.; OGAWA, S.; KUWABARA, K.; MATSUMOTO, M.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. **Nephrol. Dialysis. Transpl.**, v.11(suppl 5), p.13-16, 1996.

HORIUCHI, S. Advanced glycation end products (AGE)-modified proteins and their potential relevance to atherosclerosis. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.6, p.163-168, 1996.

HORIUCHI, S. The liver is the main site for metabolism of circulating advanced glycation end products. **J. Hepatol.**, v. 36, p. 123-125, 2002.

HORIUCHI, S.; ARAKI, N.; MORINO, Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 7329-7332, 1991.

HORL, W.H. Uremic toxins: new aspects. **J. Nephrol.**, v.13 (Suppl 3), p S83-8, 2001.

HSIEH, H.L.; SCHÄFER, B.W.; SASAKI, N.; HEIZMANN, C.W. Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.307, p.375-381, 2003.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; GRANT, P.J. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. Prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. **Diabetes**, v.47, p. 1157, 1998.

HUDSON, B.I.; BUCCIARELLI, L.G.; WENDT, T.; SAKAGUCHI, T.; LALLA, E.; QU, W.; LU, Y.; LEE, L.; STERN, D.M.; NAKA, Y.; RAMASAMY, R.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; D'AGATI, V.; SCHMIDT, A.M. Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 80-88, 2003.

HUDSON, B.I.; SCHMIDT, A.M. RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. **Pharmaceutical Res.**, v. 21, p. 1079-1086, 2004.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; FUTERS, T.S.; GRANT, P.J. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. **Diabetes**, v.50, p.1505 – 1511, 2001 a.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; GRANT, P.J.; FUTERS, T. S. Characterization of allelic and nucleotide variation between the RAGE gene on chromosome 6 and a homologous pseudogene sequence to its 5' regulatory region on chromosome 3. **Diabetes**, v.50, p.2646-2651, 2001b.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; FUTERS, T.S.; GRANT, P.J. Study of the -429 T/C and -374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease. **Diabetes Care**, v.24, p. 2004, 2001c.

HUDSON B.I., HARJA E., MOSER B., SCHMIDT A.M. Soluble levels of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? **Atheroscler. Thromb. Vas. Bio.**, v.25, p.879-82, 2005.

HURST, T.R.; LEE, R.W. Increased incidence of coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: mechanisms and management. **Ann. Intern. Med.**, v.139, p. 824-834, 2003.

HUTTUNEN, H.J.; KUJA-PANULA, J.; SORCI, G.; AGNELETTI, A.L.; DONALOT, R.; RAUVALA, H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 40096-40105, 2000.

IKEDA, K.; HIGASHI, T.; SANO, H.; JINNOUCHI, Y.; YOSHIDA, M.; ARAKI, T.; UEDA, S.; HORIUCHI, S. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. **Biochem.**, v.35, p.8075-8083, 1996.

IKEDA, K.; NAGAI, R.; SAKAMOTO, T.; SANO, H.; ARAKI, T.; SAKATA, N.; NAKAYAMA, H.; YOSHIDA, M.; UEDA, S.; HORIUCHI, S. Immunochemical approaches to AGE-structures: characterization of anti-AGE antibodies. **J. Immunol. Methods**, v.215, p.95-104, 1998.

IKONOMIDIS, I.; LEKAKIS, J.; VAMVAKOU, G.; ANDREOTTI, F.; NIHOYANNOPOULOS, P. Cigarette smoking is associated with increased circulating proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. **Am. Heart J.**, v.149, p.832-839, 2005

IRIZARRY, K.; KUSTANOVICH, V.; LI, C.; BROWN, N.; NELSON, S.; WONG, W.; LEE, C.J. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. **Nature Genetics**, v.26, p. 233-236, 2000.

ISHIHARA, K.; TSUTSUMI, K.; KAWANE, S.; NAKAJIMA, M.; KASAOKA, T. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site. **FEBS Lett.**, v.550, p. 107-113, 2003.

IWAMOTO, H.; MOTOMIYA, Y.; MIURA, K.; MORISAWA, M.; YOSHIMURA, Y.; MARUYAMA, I. Immunochemical assay of hemoglobin with N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine at lysine 66 of the β chain. **Clin. Chem.**, v. 47, p. 1249-1255, 2001.

JANISZEWSKA, H.; HAUS, O.; LAUDA-SWIECIAK, A.; PASINSKA, M.; LASKOWSKI, R.; SZYMANSKI, W.; GORSKI, B.; LUBINSKI, J. Frequency of three *BRCA1* gene founder mutations in breast/ovarian cancer families from the Pomerania-Kujawy region on Poland. **Clin. Genet.**, v.64, p. 502-508, 2003.

JANG, Y, KIM, JY, KANG, S-M, KIM, J-S, CHAE, JS, KIM, OY, KOH, SJ, LEE, HC, AHN CW, SONG YD, LEE, JH. Association of the Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic and nonobese Koreans. **Metab. Clin. Exp.** v.56, p.199-205, 2007.

JIXIONG X, BILIN X, MINGGONG Y, SHUQIN L. -429 T/C and -374 T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**; v.26, p.2696-1697, 2003.

JONO, T.; MIYAZAKI, A.; NAGAI, R.; SAWAMURA, T.; KITAMURA, T.; HORIUCHI, S. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). **FEBS Lett.**, v.511, p. 170-174, 2002.

KANG, J.H. Oxidative damage of DNA by the reaction of amino acid with methylglyoxal in the presence of Fe(III). **Intern. J. Biol. Macromol.**, v.33, p. 43-48, 2003.



KANKOVÁ, K.; VASKU, A.; HÁJEK, D.; ZAHEJSKY, J.; VASKU, V. Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complication in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.22, p. 1745, 1999.

KANKOVÁ, K.; ZÁHEJSKÝ, J.; MÁROVÁ, I.; MUZÍK, J.; KUHOVÁ, V.; BLAZKOVÁ, M.; ZNOJIL, V.; BERÁNEK, M.; VÁCHA, J. Polymorphisms in the RAGE gene influence susceptibility to diabetes-associated microvascular dermatoses in NIDDM. **J. Diabetes Complications**, v. 15, p. 185-192, 2001.

KANKOVÁ K, STEJSKALOVÁ A, HERTLOVÁ M, ZNOJIL V. Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. **Nephrol. Dial. Transplant.** v.20, p.1093-1102, 2005.

KASPER, M; FUNK, R.H.W. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). **Arch. Gerontol. Geriatrics**, v.32, p.233-243, 2001.

KHALIFAH, R.G.; BAYNES, J.W.; HUDSON, B.G. Amadorins: novel post-amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.257, p. 251-258, 1999.

KIKUCHI, S.; SHINPO, K.; TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S.; MAKITA, Z.; SASAKI, N.; TASHIRO, K. Glycation - a sweet tempter for neuronal death. **Brain Res. Rev.**, v.41, p.306-323, 2003.

KILHOVD, B.K.; BERG, T.J.; BIRKELAND, K.I. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. **Diabetes Care**, v.22, p. 1543-1548, 1999.

KILHOVD, B.K.; GIARDINO, I.; TORJESEN, P.A.; BIRKELAND, K.I.; BERG, T.J.; THORNALLEY, P.J. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v.52, p.163-167, 2003.

KIM, W.; HUDSON, B.I.; MOSER, B.; GUO, J.; RONG, L.L.; LU, Y.; QU, W.; LALLA, E.; LERNER, S.; CHEN, Y.; YAN, S.S.D.; D'AGATI, V.; NAKA, Y.; RAMASAMI, R.; HEROLD, K.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. Receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1043, p. 553-561, 2005.

KIRBIS J, MILUTINOVIC KJ, STEBLOVNIK K, TERAN N, TERZIC R, ZORE M. The-429T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factor for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. **Coll. Antropol.**, v.28, p.611-6, 2004

KISLINGER, T.; FU, C.; HUBER, B.; QU, W.; TAGUCHI, A.; YAN, S.D.; HOFMANN, M.; YAN, S.F.; PISCHETSRIEDER, M.; STERN, D.; SCHMIDT, A.M. N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **J. Biol. Chem.**, v.274, p. 31740-31749, 1999.

KIUCHI, K.; NEJIMA, J.; TAKANO, T.; OHTA M.; HASHIMOTO, H. Increased serum concentrations of advanced glycation end products: a marker of coronary artery disease activity in type 2 diabetic patients. **Heart**, v.85, p.87-91, 2001.

KÖRKÖ, J.; ANNUNEN, S.; PIHLAJAMAA, T.; PROCKOP, D.J.; ALA-KOKKO, L. Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutation:

comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.1681-1685, 1998.

KOSCHINSKY, T.; HE, C.J.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.6474-6479, 1997.

KOUDA, K.; NAKAMURA, H.; FAN, W.Y.; HORIUCHI, K.; TAKEUCHI, H. The relationship of oxidative DNA damage marker 8-hydroxydeoxyguanosine and glycoxidative damage marker pentosidine. **Clin. Biochem.**, v.2, p. 247-250, 2001.

KUMARAMANICKAVEL, G.; RAMPRASAD, V.L.; SRIPRIYA, S.; UPADYAY, N.K.; PAUL, P.G.; SHARMA, T. Association of *Gly82Ser* polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. **J. Diabetes Complications**, v.16, p. 391-395, 2002.

KUNIYASU, A.; OHGAMI, N.; HAYASHI, S.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S.; NAKAYAMA, H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. **FEBS Lett.**, v. 537, p. 85-90, 2003.

KUNIYASU, H.; CHIHARA, Y.; TAKAHASHI, T. Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. **Oncology Reports**, v. 10, p. 445-448, 2003.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, p. 937-942, 1999.

LAHIRI, DK; NURNBERGER, J.Jr A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acid Research**, v.19, p.5444, 1991.

LANDER, H.M.; TAURAS, J.M.; OGISTE, J.S.; HORI, O.; MOSS, R.A. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21<sup>ras</sup>-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.17810-17814, 1997.

LAZAR, M.A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**, v.307, p.373-375, 2005.

LEBOVITZ, H. E. Effect of the postprandial state on nontraditional risk factors. **Am J. Cardiol.**, v.88, p.20H-25H, 2001.

LI, J.; QU, X.; SCHMIDT, A.M. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphoterin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.30870-30878, 1998.

LI, J.; SCHMIDT, A.M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.16498-16506, 1997.

LI, Y.M.; DICKSON, D.W. Enhanced binding of advanced glycation endproducts (AGE) by the ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.**, v.22, p.155-8, 1997.

LIN, R.Y.; REIS, E.D.; DORE, A.T.; LU, M.; GHODSI, N.; FALLON, J.T.; FISHER, E.A.; VLASSARA, H. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces

neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. **Atherosclerosis**, v.163, p. 303-311, 2002.

LINDHOLM, E.; BAKHADZE, E.; SJÖGREN, M.; CILIO, C.M.; AGARDH, E.; GROOP, L.; AGARDH, C.-D. The -374T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetes patients. **Diabetologia**, v.49, p.2745-2755, 2006.

LIU, Y. XIANG, K. RAGE Gly82Ser polymorphism in diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, v.22, p. 616, 1999.

MA, L.; CARTER, R.J.; MORTON, A.J.; NICHOLSON, L.F.B. RAGE is expressed in pyramidal cells of the hippocampus following moderate hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Brain Res.**, v. 966, p. 167-174, 2003.

MAKITA, Z.; VLASSARA, H.; CERAMI, A.; BUCALA, R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 5133-5138, 1992.

MALHERBE, P.; RICHARDS, J.G.; GAILLARD, H.; THOMPSON, A.; DIENER, C.; SCHULER, A.; HUBER, G. cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. **Mol. Brain Res.**, v.71, p. 159-170, 1999.

MARKOFF, A.; SAVOV, A.; VLADIMIROV, V.; BOGDANOVA, N.; KREMENSKY, I.; GANEV, V. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. **Clin. Chem.**, v.43, p.30-33, 1997.

MATSUDA, H.; WANG, T.; MANAGI, H.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic Medic. Chem.**, v. 11, p.1-7, 2003.

MENE, P.; FESTUCCIA, F.; POLCI, R.; PUGLIESE, F.; CINOTTI, G.A. Diabetic nephropathy and advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.**, v.131, p. 22-32, 2001.

METZ, T.O.; ALDERSON, N.L.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W.V Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 41-49, 2003.

MIDAOU, A.E.; ELIMADI, A.; WU, L.; HADDAD, P.S.; CHAMPLAIN, J.D. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and increase in heart mitochondrial superoxide production. **Am. J. Hypertens.**, v.16, p.173-179, 2003.

MIELE, C.; RIBOULET, A.; MAITAN, M.A.; ORIENTE, F.; ROMANO, C.; FORMISANO, P.; GIUDICELLI, J.; BEGUINOT, F.; VAN OBERGHEN, E. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C $\alpha$ -mediated mechanism. **J. Biol. Chem.**, v.278, p. 47376-47387, 2003.

MITSUHASHI, T.; VLASSARA, H.; FOUNDS, H.W.; LI, Y.M. Standardizing the immunological measurement of advanced glycation endproducts using normal human serum. **J. Immunol. Methods**, v. 207, p. 79-88, 1997.

MIYATA, S.; LIU, B.F.; SHODA, H.; OHARA, T.; YAMADA, H. SUZUKI, K.; KASUGA, M. Accumulation of pyrraline-modified albumin in phagocytes due to reduced degradation by lysosomal enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 4037-4042, 1997.

MIYATA, T.; HORI, O.; ZHANG, J.H.; YAN, S.D.; FERRAN, L.; IIDA, Y.; SCHMIDT, A.M. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE- $\beta_2$ -microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 1088-1094, 1996.

MIYATA, T.; ISHIKAWA, N.; DE STRIHO, C.V. Carbonyl stress and diabetic complications. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 41, p. 1150-1158, 2003.

MIYATA, T.; KAWAI, R.; TAKETOMI, S.; SPRAGUE, S.M. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 11, p. 54-7, 1996.

MIYATA, T.; MAEDA, K.; KUROKAWA, K.; DE STRIHO, V.Y. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 12, p. 255-258, 1997.

MIYATA, T.; TANEDA, S.; KAWAI, R.; UEDA, Y.; HORIUCHI, S.; HARA, M.; MAEDA, K.; MONNIER, V.M. Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in  $\beta_2$ -microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 2353-2358, 1996.

MIYAZAKI, A.; NAKAYAMA, H.; HORIUCHI, S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 12, p. 258-262, 2002.

MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 1-15, 2003.

MOSER, B.; HUDSON, B.I.; SCHMIDT, A.M. Soluble RAGE: a hot new biomarker for the joint?. **Arthritis. Res Ther**, v.7, p.142-144, 2005.

NAGAI, R.; HAYASHI, C.M.; XIA, L.; TAKEYA, M.; HORIUCHI, S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 48905-48912, 2002.

NAGARA, R.H.; SHIPANOVA, I.N.; FAUST, F.M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 19338-19345, 1996.

NAKAMURA, N.; HASEGAWA, G.; OBAYASHI, H.; YAMAZAKI, M.; OGATA, M.; NAKANO, K.; YOSHIKAWA, T.; WATANABE, A.; KINOSHITA, S.; FUJINAMI, A.; OHTA, M.; IMAMURA, Y.; IKEDA, T. Increased concentration of pentosidine, an advanced glycation end product, and interleukin-6 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. **Diabetes Res. Clin. Practice**, v. 61, p. 93-101, 2003.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A.M.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WANG, F.; PAN, Y.C.E.; ELLISTON, K.; STERN, D.; SHAW, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycation end products of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 14998-15004, 1992.

NICHOLLS, S.J.; TUZCU, E.M.; CROWE, T.; SIPAHI, I.; SCHOENHAGEN, P.; KAPADIA, S.; HAZEN, S.L.; WUN, C.C.; NORTON, M.; NTANIOS, F.; NISSEN, S.E. Relationship

between cardiovascular risk factors and atherosclerotic disease burden measured by intravascular ultrasound. **J. Am. College Cardiol.**, v. 47, p. 103-123, 2006.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney Int.**, v. 58 (Suppl 77), p. S26-30, 2000.

OHGAMI, N.; NAGAI, R.; IKEMOTO, M.; ARAI, H.; KUNIYASU, A.; HORIUCHI, S.; NAKAYAMA, H. CD36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 3195-3202, 2001.

OKRAINEC, K.; BANERJEE, D.K.; EISENBERG, M.J. Coronary artery disease in the developing world. **Am. Heart J.**, v.148, p.7- 15, 2004.

PAUL, R.G., BAILEY, A.J. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 28, p.1297-310, 1996.

PEPPA, M.; BREM, H.; EHRLICH, P.; ZHANG, J.G.; CAI, W.; LI, Z.; CROITORU, A.; THUNG, S.; VLASSARA, H. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. **Diabetes**, v. 52, p. 2805-2813, 2003.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin. Diabetes**, v. 21, p. 186-187, 2003.

PETTERSSON-FERNHOLM, K.; FORSBLOM, C.; HUDSON, B.I.; PEROLA, M.; GRANT, P.J.; GROOP, P.H. The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v. 52, p. 891-894, 2003.

PHILLIPS, G.B.; PINKERNELL, B.H.; JING, T-Y. Are major risk factors for myocardial infarction the major predictors of degree of coronary artery disease in men? **Metabolism**, v.53, n.3, p.324-329, 2004.

PICHETH, G.; HEIDEMANN, M.; PEDROSA, F.O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; COSTANTINI, C.O.; MARTINEZ, T.L.R.; SOUZA, E.M. The -429 T>C Polymorphism of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) is Associated with Type 1 Diabetes in a Brazilian Population. **Clin Chim Acta**, (in press), 2007.

PIEGAS, L.S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J.C.; ROSSI NETO, J.M.; HOEPFNER, C.; FARRAN, J.A.; RAMOS, R.F.; TIMERMAN, A.; ESTEVES, J.P. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **Am. Heart J.**, v.146, p. 331 – 338, 2003.

PISCHKE, C.R.; WEIDNER, G.; ELLIOTT-ELLER, M.; SCHERWITZ, L.; MERRITT-WORDEN, T.A.; MARLIN, R.; LIPSENTHAL, L.; FINKEL, R.; SAUNDERS, D.; MCCORMAC, P.; SCHEER, J.M.; COLLINS, R.E.; GUARNERI, E.M.; ORNISH, D. Comparison of coronary risk factors and quality of life in coronary artery disease patients with versus without diabetes mellitus. **Am. J. Cardiol.**, v.97, p.1267 – 1273, 2006.

POIRIER P.; ECKEL R.H. Advanced glycation end products and coronary heart disease in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.23, p.1441, 2000.

POIRIER, O.; NICAUD, V.; VIONNET, N.; RAOUX, S.; TARNOW, L.; VLASSARA, H.; PARVING, H.H.; CAMBIEN, F. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, v.50, p. 1214-1218, 2001.

RAHBAR, S.; NADLER, J.L. A new rapid method to detect inhibition of Amadori product generation by  $\delta$ -gluconolactone. **Clin. Chim. Acta**, v.287, p. 123-130, 1999.

RENARD, C.; CHAPPEY, O.; WAUTIER, M.P.; NAGASHIMA, M.; LUNDH, E.; MORSER, J.; ZHAO, L.; SCHMIDT, A.M.; SCHERRMANN, J.M.; WAUTIER, J.L. Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. **Mol. Pharmacol.**, v.52, p.54-62, 1997.

RINGQVIST I, FISHER L D, MOCK M, DAVIS KB, WEDEL H, CHAITMAN BR, PASSAMANI E, RUSSELL ROJR, ALDERMAN EL, KOUCHOUKAS NT, KAISER GC, RYAN TJ , KILLIP T, FRAY D. Prognostic value of angiographic indices of coronary artery disease from the coronary artery surgery study (CASS). **J Clin Invest**; v.71, p.1854-1866, 1983.

RIZZO, M.; BARBAGALLO, C.M.; NOTO, D.; PACE, A.; CEFALÚ, A.B.; PERNICE, V.; PINTO, V.; RUBINO, A.; PIERI, D.; TRAINA, M.; FRASHERI, A.; NOTARBARTOLO, A.; AVERNA, M.R. Family history, diabetes and extension of coronary atherosclerosis are strong predictors of adverse events after PTCA: a one-year follow-up study. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 15, p. 361-367, 2005.

ROBERTS, M.J.; WONDRAK, G.T.; LAUREAN, D.C.; JACOBSON, M.K.; JACOBSON, E.L. DNA damage by carbonyl stress in human skin cells. **Mutation Res.**, v.522, p.45-56, 2003.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, J.; REQUENA, J.R.; RODRÍGUEZ-SEGADE, S. Increased concentration of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. **Clin. Chem.**, v.44, p. 250-255, 1998.

ROMERO-CORRAL, A.; MONTORI, V.M.; SOMERS, V.; KORINEK, J.; THOMAS, R. J.; ALLISON, T.G.; MOOKADAN, F.; LOPEZ-JIMENEZ, F. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. **Lancet**, v.368, p. 666- 678, 2006.

RUDOFISKY GJR, ISERMANN B, SCHILLING T, SCHIEKOFE S, ANDRASSY M, SCHNEIDER JG, MORCOS M, HUMPERT PM, SAYED AA, WITTE S, RENN W, PFOHL M, HAMANN A, NOSIKOV V, SCHLEICHER E, HARING HU, RUDOFISKY G, RITZ E, NAWROTH PP, BIERHAUS A. A 63bp deletion in the promoter of rage correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**; v.112, p.135-141, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANO, H.; NAGAI, R.; MATSUMOTO, K.; HORIUCHI, S. Receptor for proteins modified by advanced glycation endproducts (AGE) - their functional role in atherosclerosis. **Mech. Ageing Develop.**, v.107, p. 333-346, 1999.

SANTOS KG, CANANI LH, GROSS JL, TSCHIEDEL B, SOUTO KEP, ROISENBERG I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. **Mol. Genet. Metab.**; v.85, p.149-156, 2005.

SCHENK, S.; SCHRAML, P.; BENDIK, I.; LUDWIG, C. U. A novel polymorphism in the promoter of the RAGE gene is associated with non-small cell lung cancer. **Lung Cancer.**, v.32, p. 7-12, 2001.

SCHIEL, R.; FRANKE, S.; APPEL, T.; VOIGT, U.; ROSS, I.A.; KIENTSCH-ENGEL, R.; STEIN, G.; MÜLLER, U.A. Improvement in quality of diabetes control and concentrations of AGE-products in patients with type 1 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus studied over a period of 10 years (JEVIN). **J. Diabetes Complications**, v.17, p. 90-97, 2003.

SCHINDLER, T.H.; CARDENAS, J.; PRIOR, J.O.; FACTA, A.D.; KREISSL, M.C.; ZHANG, X.L.; SAYRE, J.; DAHLBOM, M.; LICINIO, J.; SCHELBERT, H.R. Relationship between increasing body weight, insulin resistance, inflammation, adipocytokine leptin, and coronary circulatory function. **J. Am. College Cardiol.**, v.47, p.1188-1195, 2006.

SCHLEICHER, E.D.; BIERHAUS, A.; HARING, H. U.; NAWROTH, P. P.; LEHMANN, R. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.**, v.131, p.1-9, 2001.

SCHLUETER, C.; HAUKE, S.; FLOHR, A.M.; ROGALLA, P.; BULLERDIEK, J. Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms - a result of regulated alternative splicing? **Biochem. Biophys. Acta**, v.1630, p. 1-6, 2003.

SCHMIDT AM, YAN SD, YAN SF, STERN DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J Clin Invest.** v.108, p.949-55, 2001

SCHMIDT, A. M. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by soluble receptor for AGE (sRAGE). **Biomed. Pharmac.**, v.52, p.321, 1998.

SCHMIDT, A. M. The receptor for advanced glycation products (RAGE): implications for the pathogenesis of diabetic complications. **Biomed.&Pharmac.**, v.50, p.395, 1996.

SCHMIDT, A.M.; DU YAN, S.; WAUTIER, J.L.; STERN, D.M. Activation of receptor for advanced glycation end products: A mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circulation Res.**, v.84, p.489-497, 1999.

SCHMIDT, A. M.; HASU, M.; POPOV, D.; ZHANG, J. H.; CHEN, J.; YAN, S. D.; BRETT, J.; CAO, R.; KUWABARA, K.; COSTACHE, G.; SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M.; STERN, D. M. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.8807-8811, 1994.

SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; CAO, R.; DU YAN, S.; BRETT, J.; WAUTIER, J.L.; KUWABARA, K.; MATSUMOTO, M.; STERN, D. **Diabetes**, v.45, p.S77-S80, 1996.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. RAGE: A new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **TEM**, v. 11, p.368-375, 2000.

SCHMIDT, A.M.; HASU, M.; POPOV, D.; ZHANG, J.H.; CHEN, J.; YAN, S.D.; BRETT, J.; CAO, R.; KUWABARA, K.; COSTACHE, G.; SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M.; STERN, D. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p. 8807-8811, 1994.

SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **TEM**, v. 11, p. 368-380, 2000.

SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; WAUTIER, J.L.; STERN, D. Activation of receptor for advanced glycation end products. A mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 84, p. 489-497, 1999.

SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; STERN, D.M. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1498, p. 99-111, 2000.

SEBEKOVA, K.; KUPCOVÁ, V.; SCHINZEL, R.; HEIDLAND, A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis - amelioration by liver transplantation. **J. Hepatol.**, v.36, p. 66-71, 2002.

SHARMA, A.M. Obesity and cardiovascular risk. **Growth Hormone IGF Research**, v.13, p.S10-S17, 2003.

SHARP, P.S.; RAINBOW, S.; MUKHERJEE, S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. **Diabet. Med.**, v.20, p. 575-579, 2003.

SHASTRY, B.S. SNP alleles in human disease and evolution. **J. Hum. Genet.**, v.46, p. 561 – 566, 2002.

SHI, M.M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. **Clin. Chem.**, v.47, p. 164-172, 2001.

SHUVAEV, V.V.; LAFFONT, I.; SEROT, J.M.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N.; SIEST, G. Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v.22, p. 397-402, 2001.

SMITH LR, HARREL FEJR, RANKIN JS, CALIFF RM, PRYOR DB, MUHLBAIER LH et al. Determinants of early versus late cardiac death in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. **Circulation**; v.84, p.245-53, 1991.

SOUSA, M. M.; YAN, S. D.; STERN, D.; SARAIVA, M. J. Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. **Lab. Invest.**, v.80, p.1101-1110, 2000.

STERN, D.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 54, p. 1615 – 1625, 2002.

STOPPER, H.; SCHINZEL, R.; SEBEKOVA, K.; HEIDLAND, A. Genotoxicity of advanced glycation end products in mammalian cells. **Cancer Lett.**, v. 190, p. 151-156, 2003.

SUGAYA, K.; FUKAGAWA, T.; MATSUMOTO, K.-I.; MITA, K., TAKAHASHI, E.I.; ANDO, A.; INOKO, H.; IKEMURA, T. Three genes in the human MHC class III region near junction with the class II: gene for receptor for advanced glycosylation end products, PBX2 homebox gene and a Notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics**, v. 23, p. 408 – 419, 1994.

SUN, M.; YOKOYAMA, M.; ISHIWATA, T.; ASANO, G. Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.79, p.207-222, 1998.

SVISTOUNOV, D.N.; BERG, T.J.; MC COURT, P.A.G.; ZYKOVA, S.N.; ELVEVOLD, K.H.; NAGAI, R.; HORIUCHI, S.; SMEDSROD, B.H. Lack of recognition of N<sup>e</sup>-



(carboxymethyl)lysine by the mouse liver reticulo-endothelial system: implications for pathophysiology. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 309, p. 786-791, 2003.

TAGUCHI, A.; BLOOD, D.C.; TORO, G.D.; CANET, A.; LEE, D.C.; QU, W.; TANJI, N.; LU, Y.; LALLA, E.; FU, C.; HOFMANN, M.A.; KISLINGER, T.; INGRAM, M.; LU, A.; TANAKA, H.; HORI, O.; OGAWA, S.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A.M. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumor growth and metastases. **Nature**, v.405, p.354-359, 2000.

TAN, C.E.; CHEW, L.S.; CHIO, L.F.; TAI, E.S.; LIM, H.S.; LIM, S.C.; JAYAKUMAR, L.; ENG, H.K.; PACKARD, C.J. Cardiovascular risk factors and LDL subfraction profile in type 2 diabetes mellitus subjects with good glycaemic control. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v.51, p.107-114, 2001.

TANAKA, N.; YONEKURA, H.; YAMAGISHI, S.; FUJIMORI, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- $\alpha$  through nuclear factor- $\kappa$ B, and by 17 $\beta$ -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 25781-25790, 2000.

TANASESCU, M.; HU, F.B.; WILLETT, W.C.; STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease among men with type 2 diabetes mellitus. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 38, p. 1836-1842, 2001.

TESSITORE, N.; LAPOLLA, A.; ARICO, C.N.; GAMMARO, L.; BERNICH, P.; FEDELE, D. Hemodialysis techniques and advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol.**, v.131, p.33-9, 2001.

TING, A.Y.; ENDY, D. Decoding NK- $\kappa$ B signaling. **Science**, v.298, p. 1189-1194, 2002.

TORRES, M.C. Polimorfismo da região promotora e do exon 3 do gene RAGE (Receptor de Produtos de Glicação Avançada) em uma amostra da população Brasileira. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2007, 53p.

TURK, Z.; LJUBIC, S.; TURK, N.; BENKO, B. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 105-115, 2001.

UCHIDA, K.; KHOR, O.T.; OYA, T.; OSAWA, T.; YASUDA, Y.; MIYATA, T. Protein modification by a Maillard reaction intermediate methylglyoxal immunochemical detection of fluorescein 5-methylimidazolone derivatives in vivo. **FEBS Lett.**, v. 410, p. 313-318, 1997.

VASAN, S.; FOILES, P.; FOUNDS, H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 419, p. 89-96, 2003.

VISSING, H.; AAGAARD, L.; TOMMERUP, N.; BOEL, E. Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3. **Genomics**, v. 24, p. 606 – 608, 1994.

VLAASSARA, H., BROWNLEE, M e CERAMI, A. High-affinity receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p.5588 – 5592, 1985.

VLAASSARA, H.; BUCALA, R. e STRIKER, L. Pathogenic effects of advanced glycosilation: biochemical, biologic and clinical implication for diabetes and aging. **Lab. Invest.**, v. 70, p.138 – 151, 1994.

VLAASSARA, H.; LI, Y. M.; IMANI, F.; WOJCIECHOWICZ, D.; YANG, Z. e CERAMI, A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. **Mol. Med.**, v. 1, p.634 – 646, 1995.

WANG, K.; ZHOU, Z.; ZHANG, M. et al. Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  down-regulates receptor for advanced glycation end products and inhibits smooth muscle cell proliferation in a diabetic and nondiabetic rat carotid artery injury model. **JPET**, v. 317, p.37-43, 2006.

WANG, R.; MITSUHIRO K., YOKOYAMA, M.; ASANO, G. Roles of advanced glycation endproducts (AGE) and receptor for AGE on vascular smooth muscle cell growth. **J. Nippon. Med. Sch.**, v. 68, p. 472-481, 2001

WANG, X.; BUCALA, R.; MILNE, R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p. 7643-7647, 1998.

WAUTIER, J. L.; WAUTIER, M. P. Pathological aspects of diabetic angiopathy. **Diabetes Metab.**, v.25 (Suppl.3), p.21-26, 1999.

WAUTIER, J. L.; WAUTIER, M. P.; CHAPPEY, O.; ZOUKOURIAN, C.; GUILLAUSSÉAU, P. J.; CAPRON, L. Diabetic erythrocytes bearing advanced glycation end products induce vascular dysfunctions. **Clin. Hem.**, v.16, p.661-667, 1996.

WAUTIER, J.L.; GUILLAUSSÉAU, P.J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes Metab.**, v. 27, p. 535-542, 2001.

WAUTIER, J.L.; WAUTIER, M.P.; SCHMIDT, A.M.; ANDERSON, G.M.; HORI, O.; ZOUKOURIAN, C.; CAPRON, L.; CHAPPEY, O.; YAN, S.D.; BRETT, J.; GUILLAUSSÉAU, P.J.; STERN, D. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 7742-7746, 1994.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; KHOA, T.N.; CAPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A.T.; CANTELOUP, S.; DAYER, J.M.; JUNGERS, P.; DRÜEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J. Immunol.**, v. 161, p. 2524-2532, 1998.

WOLFFENBUTTEL, B.H.R.; BOULANGER, C.M.; CRIJINS, F.R.L.; HUIJBERTS, M.S.P.; POITEVIN, P.; SWENNEN, G.N.M.; VASAN, S.; EGAN, J.J.; ULRICH, P. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 4630 – 4634, 1998.

WONDRAK, G. T.; CERVANTES-LAUREAN, D.; ROBERTS, M.J.; QASEM, J.G.; KIM, M.; JACOBSON, E.L.; JACOBSON, M.K. Identification of  $\alpha$ -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, p. 361-373, 2002.

WRÓBEL, K.; WRÓBEL, K.; GARAY-SEVILLA, M.E.; NAVA, L. E.; MALACARA, J. M. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 1563-1569, 1997.

WU, J.T.; WU, L.L. Linking inflammation and atherogenesis: soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. **Clin. Chem. Acta**, v. 366, p.74-80, 2006.

YAMADA, Y.; ICHIHARA, S.; IZAWA, H.; TANAKA, M.; YOKOTA, M. Genetic risk for coronary artery disease in individuals with or without type 2 diabetes. **Mol. Gen. Metabol.**, v. 81, p. 282-290, 2004.

YAMAGISHI, S.; FUJIMORI, H.; YONEKURA, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. **Diabetol.**, v.41, p.1435-1441, 1998.

YANG, S.; LITCHFIELD, J.E.; BAYNES, J.W. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 412, p. 42-46, 2003.

YANG, Z.; MAKITA, Z.; HORII, Y.; BRUNELLE, S.; CERAMI, A.; SCHAJPAL, P.; SUTHANTHIRAN, M. e VLASSARA, H. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 515 – 524, 1991.

YEH, D.D.F.; FREEMAN, M.W.; MEIGS, J.B.; GRANT, R.W. Risk factors for coronary artery disease in patients with elevated high-density lipoprotein cholesterol. **Am. J. Cardiol.**, v.99, p. 1-4, 2007.

YOKOKAWA, F.; SUGIYAMA, H.; SHIOIRI, T.; KATAGIRI, N.; ODA, O.; OGAWA, H. An expeditious synthesis of pentosidine, an advanced glycation end product. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4759-4766, 2001.

YOLOGLU, S.; SEZGIN, A.T.; SEZGIN, N.; OZDEMIR, R.; YESILADA, E.; TOPAL, E. Determination of risk factors in obese and non-obese patients with coronary artery disease. **Acta Cardiol.**, v.60, n.6, p.625-629, 2005.

YONEKURA H., YAMAMOTO Y, SAKURAI S, PETROVA RG, ABEDIN J, LI H, YASUI K, TAKEUCHI M, MAKITA Z, TAKASAWA S, OKAMOTO H, WATANABE T, YAMAMOTO H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem J.** ;370:1097-109, 2003

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; TAKAKURA, Y.; UMEKAWA, T.; KOGURE, A.; TODA, H.; YOSHIKAWA, T. Association study of G1704T and G82S polymorphisms of RAGE gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients. **Metabol. Clin. Exper.**, v.54, p.488-491, 2005

YUE, P.; MOULT, J. Identification and analysis of deleterious human SNPs. **J. Mol. Biol.**, v. 356, p.1263-1274, 2006.

YUFENG, H.; SHANYAN, L.; JIANGHUA, Z. Gene expression of receptor for advanced glycosylation end products and its modulation by aminoguanidine in diabetic kidney tissue. **Chin. Med. J.**, v.111, p.698-704, 1998.

ZHANG, J.; REN, S.; SUN, D.; SHEN, G.X. Influence of glycation on LDL-induced generation of fibrinolytic regulators in vascular endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, p. 1140-1148, 1998.

ZHANG, L.F.; ZALEWSKI, A.; LIU, Y.; MAZUREK, T.; COWAN, S.; MARTIN, J.L.; HOFMANN, S.M.; VLASSARA, H.; SHI, Y. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. **Circulation**, v. 108, p. 472-478, 2003.

ZILIN, S.; NAIFENG, L.; BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin. Chim. Acta**, v. 313, p. 69-75, 2001.

ZOCCALI, C.; MALLAMACI, F.; TRIPEPI, G. AGEs and carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v.15, p. 2:7-11, 2000.

ZOCCALLI, C.; MALLAMACI, F.; ASAHIA, K.; BENEDETTO, F.A.; TRIPEPI, G.; TRIPEPI, R.; NICOCIA, G.; BUEMI, M.; MIYATA, T. Pentosidine, carotid atherosclerosis and alterations in left ventricular geometry in hemodialysis patients. **J. Nephrol.**, v.14, p. 293-298, 2001.

**Anexo 1. Planilha de coleta de dados.**

Caracterização do Paciente	Nº registro interno	data
Nome:		____/____/____

**Dados clínicos**

N	dados	obs
1	Sexo	( 1 ) = Masculino ( 2 ) = Feminino
2	Idade	[        ] anos
3	Peso	[        ] kg
4	Altura	[        ] cm
5	IMC	Não preencher
6	Pressão Arterial (PA)	[        /        ] mmHg
7	Tabagismo	( 1 ) = Nunca fumou ( 2 ) = ex-fumante ( 3 ) = fumante
8	Diabetes	( 1 ) = Sim ( 2 ) = Não Tipo do diabetes: ( 1 ) = Tipo 1; ( 2 ) = Tipo 2; Tempo do diagnóstico do diabetes: [        ] anos
09	História familiar de Doença Arterial Coronária (DAC)	Pelo menos um parente de primeiro grau foi diagnosticado com DAC até os 55 anos (homens) ou até 65 anos (mulheres) ( 1 ) = Sim; ( 2 ) = Não
10	História clínica	Insuficiência Renal: ( 1 ) = Sim ( 2 ) = Não Tempo da doença: _____ anos Infarto: ( 1 ) = Sim ( 2 ) = Não Tempo de ocorrência do evento: _____/ (meses) ou (anos) anotar outros dados relevantes:
11	Medicamentos:	a) Hipoglicemiantes: ( 1 ) = Sim; ( 2 ) = Não Quais: b) Hipolipemiantes: ( 1 ) = Sim; ( 2 ) = Não Quais: c) Anti-hipertensivos: (1) = Sim; (2) = Não Quais: Outros:
12	Dados do cateterismo	Não é necessário preencher

## Anexo 2. Índice de Classificação da Severidade da Doença da Artéria Coronária

### (Coronary Artery Disease Severity Class Index)

SMITH, L.R. et al. Determinants of early versus late cardiac death in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* (Suppl. III), 84(5):245-253, 1991.

Extensão do CAD	Índice	obs
< 50%	<b>0</b>	<i>Cateterismo branco</i> (consideramos = 1 para facilitar cálculos estatísticos).
<b>1-VD</b> (50 – 74%)	<b>19</b>	
1-VD (50 – 74%)	<b>23</b>	
1-VD (75%)	<b>23</b>	
1-VD severo (95%)	<b>32</b>	
<b>2-VD</b>	<b>37</b>	
2-VD, 2 severos	<b>42</b>	
<b>1-VD</b> , severo, próximo descendente anterior esquerda (DA)	<b>48</b>	
2-VD severo, descendente anterior esquerda (DA)	<b>48</b>	
2-VD, severo, próximo descendente anterior esquerda (DA)	<b>56</b>	
<b>3-VD</b>	<b>56</b>	
3-VD, 1 severo	<b>63</b>	
3-VD, próximo descendente anterior esquerda (DA)	<b>67</b>	
3-VD, severo, próximo descendente anterior esquerda (DA)	<b>74</b>	
Lesão da principal esquerda (Tronco) [left main disease]	<b>82</b>	
Lesão severa na principal esquerda – Tronco(95%)	<b>100</b>	
Avaliar:		
1. Presença de <i>STENT</i>		
2. Presença de <i>by pass</i>		

VD = vaso lesado (*vessel disease*)

### Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido – HC - UFPR

a) Você esta sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Correlação entre os produtos finais de glicação avançados (AGEs), polimorfismo do gene do receptor para AGE (RAGE) e fatores de risco para doença arterial coronária em indivíduos normais e diabéticos”. É através das pesquisas que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa quantificando no sangue substâncias denominadas Produtos de Glicação Avançados (AGEs) e pesquisando polimorfismos do receptor RAGE é procurar novos marcadores para melhor conhecer, controlar e monitorar o paciente com *diabetes mellitus* e/ou doença arterial coronária.

c) Caso você participe desta pesquisa, será necessário coletar uma amostra de sangue. Dados biométricos (idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico, cineangiocoronariografia) serão repassados para o pesquisador pelo seu médico. A coleta de sangue será realizada no Laboratório de Bioquímica Clínica – UFPR (Rua Lothário Meissner, 3400, 80310-430 Curitiba-PR) ou na **Unidade de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Rua General Carneiro, 181, Curitiba –PR)**

d) O sangue será coletado durante o procedimento de cineangiocoronariografia pelo médico que realiza o procedimento. Será tirado um volume de sangue mais ou menos igual a duas colheres de sopa cheias (10 mL).

e) Esta coleta não acrescenta nenhum risco adicional ao procedimento de cineangiocoronariografia que você vai realizar.

f) Os benefícios esperados são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o *diabetes mellitus* e a doença arterial coronária. 2) Expectativa do desenvolvimento de novos marcadores e ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento de quem sobre das doenças citadas anteriormente.

g) Eu, Geraldo Picheth, Farmacêutico-Bioquímico, professor de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e responsável por esta pesquisa, poderei ser contatado nos telefones: (41)-274-5593, (41)-360-4067 ou (41)-9106-7290 a qualquer hora, conforme consta no padrão ético e vigente no Brasil.

h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes e depois do estudo.

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção do seu tratamento ou na atenção recebida do seu médico.

j) As informações relacionadas a esta pesquisa poderão ser inspecionadas pelos responsáveis pela pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida (não aparecerá seu nome em hipótese nenhuma).

k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc) não serão de responsabilidade do paciente.

l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

n) Cópia dos resultados da pesquisa serão distribuídas aos médicos que encaminharem pacientes para a pesquisa.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação na pesquisa a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que essa decisão afete meu relacionamento com o meu médico. Eu entendi que não haverá qualquer custo para mim.

Eu concordo voluntariamente a participar deste estudo.

data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável legal

data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

#### Anexo 4. Isolamento de DNA genômico de sangue total

Etapa	ação
1	Colocar 1 mL de sangue total em tubo de microcentrífuga de 1,6 mL estéril
2	Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min a TA. Remover o plasma com pipeta (descartar ou guardar)
3	Adicionar ao sedimento 900 µL de tampão TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5%. Homogeneizar por inversão várias vezes.
4	Centrifugar a 10.000 rpm por 3 minutos e desprezar o sobrenadante;
5	Adicionar ao sedimento 1 mL de TKM1 (sem Triton) e homogeneizar em agitador por alguns segundos. Centrifugar a 10.000 rpm por 3 min;
6	Repetir a etapa anterior (#5) cerca de 3 vezes, ou até que o sedimento (contendo o núcleo dos leucócitos se torne esbranquiçado (sem hemoglobina).
7	Descartar o sobrenadante. Adicionar ao sedimento 20 µL de SDS 10%, homogeneizar em agitador por alguns segundos e incubar a 56°C por 15 min. Pode deixar mais tempo
8	Adicionar 100 µL de NaCl 5M (ou 6M) e homogeneizar bem em agitador por alguns segundos. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min.
9	Transferir o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga estéril e adicionar 2 volumes de etanol absoluto (~ 1 mL). Inverter o tubo várias vezes para precipitar o DNA
10	Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min a TA e descartar o sobrenadante cuidando para não ressuspender (ou perder) o precipitado (DNA)
11	Adicionar 1 mL de etanol a 70%. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 min a TA e desprezar o sobrenadante, cuidando de não ressuspender o precipitado (DNA). Repetir a etapa anterior 2 a 3 vezes
12	Após a última centrifugação colocar o tubo de microcentrífuga sobre um papel absorvente limpo até que todo o etanol tenha evaporado
13	Ressuspender o DNA em 100 µL tampão TE ou água Milli-Q estéril. Incubar a 56 °C por 15 min para hidratar o DNA
14	Armazenar o DNA a 4°C para uso imediato ou a -20°C para longo período
15	Quantificar o DNA por espectrofotometria no UV (260/280) Analisar a integridade do DNA extraído por eletroforese em gel de agar ou agarose 0,8% e visualização com brometo de etídeo.